

Energimetabolisme i skjelettmuskelceller med endrede lipiddråpeproteiner

Studier på myotuber fra *PLIN2*^{-/-}-mus

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Johanne Nyquist Jensen

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

November 2014

Energimetabolisme i skjelettmuskelceller med endrede lipiddråpeproteiner

Studier på myotuber fra *PLIN2*^{-/-}-mus

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Johanne Nyquist Jensen



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere:

Professor Arild C. Rustan
Professor G. Hege Thoresen
Stipendiat Yuan Zeng Feng

© Johanne Nyquist Jensen

2014

Energimetabolisme i skjelettmuskelceller med endrede lipiddråpeproteiner

Johanne Nyquist Jensen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2013 til november 2014.

En stor takk rettes til veilederne mine: Professor Arild C. Rustan for god veiledning, hjelp, engasjement og nyttige tilbakemeldinger, professor G. Hege Thoresen for god veiledning og uvurdelig hjelp med dataprogrammer og figurer til oppgaven, og stipendiat Yuan Zeng Feng for å ha lært bort alle sine beste triks for dyrking av museceller og beregning av resultater. Denne oppgaven hadde ikke blitt til uten deres tålmodighet, engasjement og faglige kunnskaper! Takk også til Jenny, Camilla og resten av gjengen i Gydas vei 8 for kyndig assistanse når uforutsette problemer har dukket opp, for et trivelig arbeidsmiljø og et hyggelig år sammen med dere.

Til Kristine og resten av mine medstudenter: Takk for fem flotte år ved Farmasøytisk institutt. Dere vil bli savnet!

Til mamma og pappa: Takk for all støtte gjennom en lang studietid. Hjertelig takk for alt dere gjør for vår familie!

Til slutt (og ikke minst): Takk til gutta mine, Erlend og Iver. Til Erlend for at du har holdt ut med meg gjennom svangerskap, fødsel og masteroppgave – samtidig! Til Iver for tålmodighet og oppmuntrende gurlgling når mamma har brukt mye tid på kontoret.

Trøgstad, 20.11.2014

Johanne Nyquist Jensen.

Abstract.

Background: Type 2 diabetes (T2D) and metabolic syndrome often occur concurrently, and, together with obesity, these conditions have become some of our time's great global health challenges. Both conditions are related to insulin resistance in adipose tissue and skeletal muscles. Insulin resistance is a metabolic condition where a physiological concentration of insulin gives a lower biological response than expected. It is thought that insulin resistance is associated with an increased concentration of intramyocellular lipids (IMCL) in skeletal muscles, and accumulation of lipid intermediates like acyl-CoA, diacylglycerol (DAG) and ceramides. However, studies also show that athletes in endurance sports have increased levels of IMCL without showing signs of insulin resistance. It is therefore believed that increased accumulation and tighter packing of lipids in IMCL can function to protect the cell against insulin resistance. Upon uptake in myotubes, free fatty acids (FFA) may either be β -oxidized to produce energy in the mitochondria, or they can be stored as triacylglycerols (TAG) in lipid droplets (LDs) in the cytosol. Lipid droplets are dynamic organelles, consisting of a hydrophobic core of neutral lipids (e.g. TAG and cholesterol ester) surrounded by phospholipids and lipid-associated proteins (perilipins, PLINs). Perilipins are shown to be important regulators for LD turnover in the cell. Out of the five known PLINs, perilipin 2 (PLIN2) shows the highest expression in skeletal muscle. Although the mechanisms are partly unknown, PLIN2 has been shown to play a role in energy metabolism of skeletal muscle, i.e. through storage and turnover of TAG in LDs. Increased expression of PLIN2 has also been shown to correlate with increased insulin sensitivity. A main theory of PLIN2's mode of action is that the protein protects TAG in LDs against lipolysis by regulating access of lipases to the lipids within the LD core.

Methods: *PLIN2*^{+/+} and *PLIN2*^{-/-} myoblasts from mice were grown and differentiated into myotubes *in vitro*. Myotubes were labeled with [¹⁴C]oleic acid (OA, 100 or 400 μ M) for 24 hours prior to the experiment with no substrate during 4 hours of CO₂ assessment. To assess the effect on lipid turnover, myotubes were treated with various treatments such as the hormone sensitive lipase inhibitor CAY-10499, adipose tissue triglyceride lipase inhibitor paraoxone (E600), a combination of the two, or the acyl-CoA synthetase inhibitor triacsin C. Treatments were done either chronically (for 24 hours, inhibitors added to the pretreatment media) or acute (for 4 hours, inhibitors added to the trapping media). After labeling with [¹⁴C]OA for 24 hours, the concentration of acid soluble metabolites (ASM, β -oxidation) in the

media was measured. The degree of lipolysis in the myotubes was measured in the media after 4 hours of CO₂ assessment. To assess whether availability of lipids affect the glucose uptake, differentiated *PLIN2*^{+/+} and *PLIN2*^{-/-} myotubes were pretreated with 100 μM OA for 24 hours, before measuring uptake of [³H]deoxyglucose (DOG) in the presence or absence of insulin for 1 hour. Glycogen synthesis assessed as [¹⁴C]glucose incorporation into glycogen was measured for 3 hours after 24 hours pretreatment with OA and in presence/absence of insulin. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed to assess the mRNA expression of PLIN2 and other genes important for energy metabolism in skeletal muscle.

Results: We observed a significant increase in oxidation of OA to CO₂ in the *PLIN2*^{-/-} myotubes compared to the *PLIN2*^{+/+} myotubes. There was also a significant decrease in β-oxidation to ASM and accumulation of lipids in *PLIN2*^{-/-} myotubes. The addition of various inhibitors generally decreased the oxidation and increased the accumulation of lipids, and this effect was equal between *PLIN2*^{-/-} and *PLIN2*^{+/+} myotubes. We also found that the degree of lipolysis and relative lipolysis was significantly decreased in the *PLIN2*^{-/-} myotubes. No differences were observed in uptake of DOG between the two donor types, and the presence of OA or insulin did not alter this uptake. We observed a significant increase in glycogen synthesis in *PLIN2*^{-/-} myotubes after pretreatment with 100 μM OA and in presence of insulin. mRNA expression of PGC1α, DGAT2, CD36, CPT1b, Cyc1 and PDK4 were lower in *PLIN2*^{-/-} myotubes compared to *PLIN2*^{+/+} myotubes, whereas expression of PLIN4 and PLIN5 were higher in *PLIN2*^{-/-} myotubes than *PLIN2*^{+/+} myotubes.

Conclusion: Lack of PLIN2 protein reduces the myotubes' ability to store FFA as TAG in LDs, which leads to an increased turnover of lipids in the myotubes. Lipolysis was also significantly decreased in *PLIN2*^{-/-} myotubes. The increase in lipid catabolism might occur preferentially over glucose metabolism in the *PLIN2*^{-/-} myotubes. The absence of PLIN2 also affects the expression levels of many genes important for both lipid and glucose metabolism. To compensate for lack of PLIN2, genes coding for other PLINs may be upregulated.

Sammendrag

Innledning: Type 2 diabetes (T2D) og metabolsk syndrom er to tilstander som ofte opptrer samtidig, og sammen med overvekt og fedme har disse tilstandene blitt vår tids store helseutfordring på verdensbasis. Tilstandene er bl.a. relatert til insulinresistens i fettvev og skjelettmuskler. Insulinresistens er en metabolsk tilstand hvor fysiologiske konsentrasjoner av insulin gir lavere biologisk respons enn normalt. Økte mengder intramyocellulære lipider (IMCL) i skjelettmuskel, samt opphopning av lipidintermediater som acyl-CoA, diacylglycerol (DAG) og ceramider, er antatt å være den bakenforliggende årsaken til insulinresistens. På en annen side er det vist at IMCL er økt i godt trente utøvere av utholdenhetsidretter uten at disse personene viser noen form for insulinresistens. På bakgrunn av dette er det fremsatt teorier om at økt akkumulering og pakking av lipider i IMCL kan beskytte cellen mot insulinresistens. Når frie fettsyrer (FFA) tas opp i myotubene kan de enten undergå β -oksidasjon og omdannes til energi i mitokondriene, eller de kan lagres som triglyserider (TAG) i lipiddråper (LD) i cytosol. LD er dynamiske strukturer som består av en lipofil kjerne av nøytrale lipider (TAG og kolesterolster) omringet av fosfolipider og lipiddråpeassosierte proteiner (perilipiner, PLINs). Det er vist at PLIN-proteiner er viktige regulatorer for omsetning av LD i cellene. Det finnes fem kjente perilipiner, hvorav perilipin 2 (PLIN2) er høyest uttrykt i skjelettmuskel. Det er vist at PLIN2 spiller en rolle i skjelettmusklens energiomsetning, men mekanismene for dette er foreløpig bare delvis kartlagt. Det er vist at PLIN2 er viktig for lagring av lipider som TAG i LD. Det er også vist at økt uttrykk av PLIN2 i cellene har en sammenheng med økt insulinsensitivitet. En av hovedteoriene om PLIN2s virkningsmekanisme går ut på at proteinet beskytter TAG i LD mot lipolyse ved å hindre kontakt mellom ulike lipaser og LD.

Metode: Myoblaster fra $PLIN2^{+/+}$ - og $PLIN2^{-/-}$ - mus ble dyrket og differensiert til myotuber *in vitro*. Myotuber ble så formerket med [^{14}C]oljesyre (OA, 100 eller 400 μM) i 24 timer før det ble utført substratoksidasjonsforsøk over 4 timer med ikke-radioaktivt trappemedium for å fange frigjort CO_2 . For å undersøke ulike lipolysehemmeres effekt på lipidmetabolismen ble myotubene også behandlet med hormonsensitiv lipase (HSL)-hemmeren CAY-10499, fettvevstriglyseridlipase (ATGL)-hemmeren paraoxone (E600), disse to substansene i kombinasjon eller acyl-CoA syntetasehemmeren triacsin C. Behandlingen ble gjort enten kronisk over 24-timer (substansene tilsatt i formerkingsmediet) eller akutt i 4 timer (substansene tilsatt i trappemediet). Mengden syreløselige metabolitter (ASM, mål for β -

oksidasjon) i mediet ble målt etter 24-timers formerking med [^{14}C]OA. Graden av lipolyse i myotubene ble målt i mediet etter 4-timers trapping. For å undersøke om tilgang av lipider påvirket opptak av glukose ble differensierte *PLIN2*^{+/+}- og *PLIN2*^{-/-}-myotuber forbehandlet med 100 μM OA i 24 timer, før man målte opptaket av [^3H]deoksyglukose (DOG) i fravær/nærvær av insulin i løpet av 1 time. Glykogensyntese fra [^{14}C]glukose i myotubene ble målt over 3 timer etter forbehandling med OA i 24 timer og i nærvær/fravær av insulin. Kvantitativ real-time polymerase kjedereaksjon (qPCR) ble brukt for å undersøke mRNA-uttrykk av *PLIN2* og andre gener viktig for energimetabolismen i myotubene.

Resultater: Det ble observert signifikant økt oksidasjon av OA til CO_2 i *PLIN2*^{-/-}-myotuber sammenlignet med *PLIN2*^{+/+}-myotuber. β -oksidasjon til syreløselige metabolitter (ASM) og akkumulering (CA) av lipider i myotubene var signifikant redusert i *PLIN2*^{-/-}-myotuber sammenlignet med *PLIN2*^{+/+}-myotuber. Behandling med ulike hemmere resulterte generelt i redusert oksidasjon og økt akkumulering av OA i myotubene. Effekten av hemmere var lik mellom donortypene. Det ble funnet at graden av lipolyse og relativ lipolyse (lipolyse relatert til akkumulert OA) var signifikant redusert i *PLIN2*^{-/-}-myotuber sammenlignet med *PLIN2*^{+/+}-myotuber. Det ble ikke observert forskjell i DOG-opptak mellom donortypene, og opptaket ble ikke påvirket i nærvær av OA eller insulin. Det ble funnet økt glykogensyntese i *PLIN2*^{-/-}-myotuber sammenlignet med *PLIN2*^{+/+}-myotuber etter forbehandling med 100 μM OA og i nærvær av insulin. Genekspresjonsstudier viste redusert mRNA-uttrykk for *PGC1 α* , *DGAT2*, *CD36*, *CPT1b*, *Cyc1* og *PDK4* i *PLIN2*^{-/-}-myotuber sammenlignet med *PLIN2*^{+/+}-myotuber, mens uttrykket av *PLIN4* og *PLIN5* var økt i *PLIN2*^{-/-}-myotuber sammenlignet med *PLIN2*^{+/+}-myotuber.

Konklusjon: Mangel på proteinet *PLIN2* reduserer myotubenes evne til å lagre FFA som TAG i LD, og turnover av lipider i *PLIN2*^{-/-}-myotubene vil derfor øke. Graden av lipolyse var også signifikant redusert i *PLIN2*^{-/-}-myotuber. Økt fettsyrekatabolisme kan gå på bekostning av glukosemetabolismen i *PLIN2*^{-/-}-myotubene. Mangel på *PLIN2* endret uttrykket av mange gener viktige for både lipid- og glukosemetabolismen i myotubene. Økt uttrykk av andre *PLIN*-gener kan være kompensatorisk når *PLIN2*-protein mangler.

Forkortelser

AC	Adenylsyklase
ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
ADP	Adenosindifosfat
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosin 5'-monofosfat
AMPK	5'-adenosin monofosfataktivert proteinkinase
AMPKK	AMPK-kinase
ASM	Analyse av syreløselige metabolitter
ATGL	Fettvevstriglyceridlipase
ATP	Adenosin 5'-trifosfat
BCA	Bicinchoninnic Acid
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert
CaMKK β	Ca ²⁺ /kalmodulinavhengig proteinkinase β
cAMP	Syklisk-adenosinmonofosfat
CAT	Karnitintranslokase
cDNA	Komplementært deoksyribonukleinsyre
CKK	Kolecystokinin
CoA	Koenzym A
CPT1	Karnitinpalmitoyltransferase-1
X	

CPT2	Karnitinpalmitoyltransferase-2
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DOG	2-Deoksyglukose
ER	Endoplasmatisk retikulum
ETC	Elektrontransportkjeden
FABP _c	Fettsyrebindende protein-cytosol
FABP _{pm}	Fettsyrebindende protein-plasmamembran
FADH ₂	Flavin-adenin-dinukleotid
FAT/CD36	Fettsyretranslokase/"cluster of differentiation 36"
FATP	Fettsyretransportprotein
FATP1	Fettsyretransportprotein 1
FCCP	Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenylhydrazon
FFA	Frige fettsyrer (Free Fatty Acids)
FITp2	Fat storage-inducing transmembrane protein 2
FRET	"Fluorescence resonanse energy transfer"
GIP	Gastrisk inhibitorisk peptid
GLP-1	Glukagonlignende peptid-1
GLUT1	Glukosetransportør 1

GLUT4	Glukosetransportør 4
GLUT-proteiner	Glukosetransportørproteiner
GTP	Guanosin trifosfat
Hb A _{1c}	Glykosylert hemoglobin
HDL	“High-density” lipoprotein
HSL	Hormonsensitiv lipase
IDF	International Diabetes Federation
Ikk- β	Inhibitorisk kappa-kinase-beta
IL-6	Interleukin-6
IMCL	Intramyocellulære lipider
IMTG	Intramyocellulære triglyserider
IRS-1	Insulinreseptor-substrat-1
KD	Knockdown
KMI	Kroppsmasseindeks (Body Mass Index)
KO	Knockout/utslått
LCFA-CoA	Langkjedet fri fettsyre-CoenzymA
LD	Lipiddråper
LDL	“Low-density” lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipase
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid

OA	Oljesyre
PDE	Fosfodiesterase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-komplekset
PFK-1	Fosfofruktokinase-1
P-glukose	Plasmaglukose
PI3-K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKC ζ	Proteinkinase C-zeta
PLIN 1,2,3,4,5	Perilipin 1,2,3,4,5
<i>PLIN2</i> ^{-/-} -KO	Perilipin2-knockout
<i>PLIN2</i> ^{+/+} -WT	Perilipin2-villtype
PPAR α	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor alfa
PPAR β/δ	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor beta/delta
PPAR γ	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor gamma
PP2A	Proteinfosfatase 2A
qPCR	Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
RNS	Reaktive nitrogenspesier
ROS	Reaktive oksygenspesier

Rpm	Rotasjoner per minutt
RT	Revers transkriptase
ssDNA	Enkelttrådet deoksyribonukleinsyre
TAG	Triacyglyserol/triglyserider
TCA	Trikarboksylsyre syklus
TNF- α	Tumor nekrosefaktor-alfa
T2D	Diabetes mellitus type 2
WHO	Verdens helseorganisasjon (World Health Organization)
WT	Villtype (wild type)

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Overvekt og fedme	1
1.2	Abdominal fedme og metabolsk syndrom.....	2
1.3	Diabetes mellitus type 2	3
1.4	Skjelettmuskel	5
1.4.1	Skjelettmuskelens oppbygning og struktur	5
1.4.2	Skjelettmuskelens kontraksjon.....	6
1.4.3	Satelittceller.....	7
1.5	Glukosemetabolisme i skjelettmuskel	7
1.5.1	Insulinmediert opptak av glukose	8
1.5.2	Kontraksjonsmediert opptak av glukose	8
1.5.3	Oksidasjon av glukose og glykolyse	9
1.5.4	Lagring av glukose i cellene.....	10
1.6	Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel.....	11
1.6.1	Opptak av fettsyrer fra fordøyelseskanalen.....	11
1.6.2	Opptak av fettsyrer til organer og vev.....	12
1.6.3	Fordeling av fettsyrer i cellene.....	13
1.6.4	Omgjøring av fettsyrer til energi.....	14
1.6.5	Lipiddråper	16
1.6.6	Perilipinene (PLIN-familien)	17
1.6.7	Perilipin 2 (PLIN2).....	18
1.7	Randles syklus: Fettsyrrers hemming av glukosemetabolismen	20
1.8	Insulinresistens	21
1.8.1	Lipidindusert insulinresistens.....	22
1.8.2	“Idrettsparadokset”.....	24
1.9	Substanser benyttet under forsøkene	25
1.9.1	CAY-10499	25
1.9.2	Paraoxone (E600, dietyl <i>p</i> -nitrofenylfosfat).....	25
1.9.3	Triacsin C	25
1.9.4	Insulin.....	26
1.10	Hensikt og mål med oppgaven.....	27

2	Materiale og metode.....	28
2.1	Materialer.....	28
2.1.1	Kjemikalier og reagenser	28
2.1.2	Utstyr.....	29
2.2	Dyrkning av celler	29
2.2.1	Karakterisering av celler brukt i forsøk.....	29
2.2.2	Uttak av celler fra cellebank.....	30
2.2.3	Høsting av celler til videre utsåing.....	30
2.2.4	Telling av celler i suspensjon	30
2.2.5	Coating av cellebrønner med 2 % matrigel matriks	31
2.2.6	Utsåing av celler til forsøk	31
2.2.7	Nedfrysning av celler til cellebank.....	32
2.3	Deoksyglukoseopptaksforsøk.....	32
2.4	Glykogensynteseforsøk	33
2.5	Substratoksidasjonsforsøk	34
2.5.1	Formerking med radioaktiv oljesyre	35
2.5.2	Oksidasjonsforsøkene.....	36
2.5.3	Måling av celleassosiert radioaktiv oljesyre	36
2.6	Analyse av syreløselige metabolitter (ASM).....	37
2.7	Proteinmålinger	37
2.7.1	Bradford-metoden	37
2.7.2	Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (BCA-metoden)	38
2.8	Måling av lipolyse	39
2.9	Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR).....	39
2.9.1	Høsting av celler til real-time qPCR	42
2.9.2	Isolering av total RNA fra lyserte celler	42
2.9.3	Kvantifisering av isolert RNA.....	42
2.9.4	Syntese av cDNA	42
2.9.5	Real-time kvantitativ PCR-analyse med SybrGreen-detektor	43
2.10	Statistiske analyser.....	45
3	Resultater.....	46
3.1	qPCR.....	46
3.1.1	Testing av tilstedeværelse av PLIN2 i <i>PLIN2-KO</i> -myotuber	46

3.1.2	Genekspresjonsstudier. Identifisering av andre gener viktige for energimetabolismen ved qPCR	47
3.2	Lipidforsøkene.....	49
3.2.1	Substratoksidasjonsforsøkene	49
3.2.2	Lipolyse av oljesyre	61
3.3	Glukoseforsøkene	66
3.3.1	Opptak av deoksyglukose (DOG-forsøket).....	66
3.3.2	Glykogensynteseforsøket	68
4	Diskusjon.....	70
4.1	Validering av musecellemodellen	70
4.2	Oppsummering av oppgavens hovedfunn	70
4.2.1	Oljesyreakkumulering og oksidasjon (CO ₂ og ASM).....	70
4.2.2	Effekter av ulike behandlinger	72
4.2.3	Opptak av 2-deoksyglukose og glykogensyntese.....	74
4.3	Betydning av PLIN2 for lipidmetabolismen i myotubene.....	74
4.4	Betydning av PLIN2 for glukosemetabolismen i myotubene	78
4.5	PLIN2 og hemming av HSL.....	79
4.6	PLIN2 og hemming av ATGL.....	80
4.7	PLIN2 og hemming av HSL og ATGL i kombinasjon	81
4.8	PLIN2 og hemming av acyl-CoA syntetase	82
4.9	Genekspresjonsstudier	82
5	Konklusjon	85
	Register.....	86
	Litteraturliste	87
6	Vedlegg	92
6.1	Medier til celledyrking.	92
6.1.1	ferasjonsmedium.	92
6.1.2	Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium.	92
6.1.3	Fusjonsmedium (differensieringsmedium).	92
6.1.4	Frysemedium.	93
6.2	0,01 % kollagen I-behandlede celleflasker.....	93
6.3	Andre medier.	93
6.3.1	Medier til substratoksidasjonsforsøk.....	93

6.3.2	Medier til DOG-forsøk.....	94
6.3.3	Forsøksmedium til glykogensynteseforsøk.....	95
6.3.4	1 x høstebuffer (PBS).....	95
6.3.5	DPBS med HEPES.....	96
6.3.6	Primere til real-time qPCR med SYBR Green.....	96
6.3.7	Oppsett DOG-forsøk.....	97
6.3.8	Oppsett glykogensynteseforsøk.....	97
6.3.9	Oppsett substratoksidasjonsforsøk.....	97
6.3.10	Oppsett til utsåing av celler til qPCR-forsøk.....	98

1 Innledning

1.1 Overvekt og fedme

Overvekt og fedme har blitt en av de største helseutfordringene på verdensbasis i vår tid. Verdens helsorganisasjon (WHO) anslår at tallet på personer som lider av fedme er nær doblet siden 1980, og 65 % av verdens befolkning lever nå i land hvor overvekt og fedme krever flere menneskeliv enn det undervekt og mangel på mat gjør. I 2008 publiserte WHO at over 1,4 milliarder av verdens befolkning over 20 år var overvektige. Av disse led omtrent 200 millioner menn og 300 millioner kvinner av fedme. I 2011 publiserte WHO at mer enn 40 millioner barn under fem år var overvektige [1].

Hovedårsaken til overvekt og fedme er en kombinasjon av arv og miljø. Mange personer er genetisk disponert for å utvikle fedme. I tillegg er kaloriholdig mat lett tilgjengelig og relativt billig i store deler av verden. Arv kombinert med en usunn livsstil og inaktivitet gir lett overvekt [2].

For å definere ulike vektrelaterte helsetilstander bruker WHO kroppsmasseindeks (KMI). Kroppsmasseindeks defineres som personens vekt i kilogram over kvadratet av personens høyde i meter, kg/m^2 [3].

VEKTKLASSIFISERING:	KMI (kg/m^2):
UNDERVEKT: <ul style="list-style-type: none">• Alvorlig undervekt:• Moderat undervekt:• Mild undervekt:	< 18,5 < 16,0 16,0-16,99 17,0-18,49
NORMALVEKT:	18,5-24,99
OVERVEKT (prefedme):	≥ 25
FEDME (sykelig overvekt): <ul style="list-style-type: none">• Fedme klasse I:• Fedme klasse II:• Fedme klasse III:	≥ 30 30,0-34,9 35,0-39,9 ≥ 40

Tabell 1.1: WHO's KMI-klassifisering. Modifisert fra [3].

KMI-verdier er uavhengige av alder og kjønn, og det tas heller ikke hensyn til forskjellige kroppsbygninger, samt fordeling av fettvev og muskelmasse [3].

I 2008 anslo WHO at omtrent 62 % av alle menn og 48 % av alle kvinner i Norge var overvektige ($KMI \geq 25$) [4].

Overvekt og fedme er sterkt knyttet til tilstander som metabolsk syndrom og type 2 diabetes (T2D). Flertallet av pasienter med T2D er klassifisert som overvektige eller fete. Det er anslått at en global diabetes-epidemi er på vei, og at prevalensen av T2D vil øke mest i utviklingsland som India og Kina. Denne epidemien vil koste verdenssamfunnet enorme summer [5].

Vanligste behandlingsform for overvekt og fedme i Norge i dag er kostholdsintervensjon og økt fysisk aktivitet. Det er kun ett legemiddel, orlistat (Xenical®), som er markedsført og godkjent for behandling av overvekt og fedme. Orlistat er en pankreaslipasehemmer og virker ved å spesifikt hydrolysere triglyserider (TAG) i tarmen slik at omtrent 30 % av TAG ikke tas opp i kroppen, men skilles ut via avføringen. Orlistat har vist å gi en vektreduksjon på 2-5 kg i forhold til placebo når behandlingen kombineres med livsstilsråd om kosthold og fysisk aktivitet. Kostrådene består primært av å begrense energi- og fettinntaket. Behandling med orlistat er indisert ved helseskadelig fedme ($KMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) eller ved $KMI \geq 28 \text{ kg/m}^2$ med andre risikofaktorer som hypertensjon, diabetes og dyslipidemi i tillegg. Behandlingen passer bra for personer med metabolsk syndrom [6].

1.2 Abdominal fedme og metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom og type 2-diabetes (T2D) er tilstander som er sterkt assosierte med hverandre [5]. Spesielt spiller visceral eller abdominal fedme en sentral rolle i utviklingen av metabolsk syndrom, sammen med faktorer som fysisk inaktivitet, økende alder, hormonforstyrrelser og genetiske disposisjoner. Tilstanden starter med abdominal fedme og/eller insulinresistens og utvikles over tid [7]. Individer med høy livvidde viser en større tendens til å utvikle metabolsk syndrom enn personer med mye subcutant fett. Abdominalt fett er hyperlipolytisk, hvilket betyr at en større mengde frie fettsyrer (FFA) blir frigjort ved lipolyse fra TAG og disse vil bli fraktet via portalvenen til leveren i stedet for ut i systemkretsløpet på grunn av fettvevets plassering. I tillegg er abdominalt fettvev immunt mot insulinets antilipolytiske effekt, og dette vil forstyrre normal metabolisme av FFA. Konsekvensen av dette er at levermetabolismen blir påvirket, noe som kan føre til

dyslipidemi, hyperinsulinemi (økt produksjon av insulin i pankreas) og nedsatt glukosetoleranse [8].

Metabolsk syndrom brukes som en samlebetegnelse på helsetilstander som samlet gir økt risiko for iskemiske hjerte- og karsykdommer og økt risiko for diabetes. International Diabetes Federation (IDF) regner med at ¼ av verdens voksne befolkning lider av metabolsk syndrom, og organisasjonen definerer sykdommen som en tilstand med abdominal fedme (livvidde menn ≥ 94 cm, livvidde kvinner ≥ 80 cm) i tillegg til minst to av følgende risikofaktorer [9]:

- Forhøyet triglyseridnivå ($\geq 1,7$ mmol/l) eller initiert behandling for dette.
- Redusert nivå av "high-density" lipoprotein (HDL)-kolesterolnivå (< 1.03 mmol/l for menn og $< 1,29$ mmol/l for kvinner)
- Hypertensjon (systolisk blodtrykk ≥ 130 mmHg og diastolisk blodtrykk ≥ 85 mmHg) eller initiert behandling for dette.
- Forhøyet fastende blodglukose ($\geq 5,6$ mmol/l) eller tidligere diagnostisert T2D.

Metabolsk syndrom har også blitt assosiert med andre tilstander som fettlever, polycystisk ovariesyndrom, søvnapné, gallestein og enkelte former for kreft [7].

Det finnes ikke én spesifikk behandling av denne tilstanden, men de forskjellige risikofaktorene må behandles hver for seg, og polyfarmasi forekommer ofte hos disse pasientene. I tillegg er økt fysisk aktivitet, endret kosthold og vektreduksjon en viktig del av behandlingen. Det finnes også andre definisjoner av metabolsk syndrom som inkluderer koagulasjonsfaktorer som en del av syndromet [10] [7].

1.3 Diabetes mellitus type 2

Diabetes mellitus type 2 (T2D) er et direkte resultat av insulinresistens i muskel- og fettvev og hyperinsulinemi. Insulinresistens er nærmere omtalt i avsnitt 1.8. Sykdommen kjennetegnes av nedsatt glukosetoleranse og hyperinsulinemi. Sykdommen kan i prinsippet debutere i alle aldre, men de fleste av pasientene er over 30 år når de får diagnosen. T2D utvikles gradvis (sammenliknet med diabetes mellitus type 1), gjerne etter mange år med

overvekt og fedme, samt metabolsk syndrom. Sykdommen kan også forekomme etter langtids bruk av legemidler som glukokortikoider, uselektive adrenerge betareseptorantagonister (uselektive β -blokkere) og høye doser tiaziddiuretika [6].

Før T2D er et faktum vil pasienten gjerne være gjennom en tilstand som kalles prediabetes. Prediabetes kjennetegnes av at plasmaglukosenivåene er høyere enn normalt, men ikke riktig høye nok til at man får diagnosen T2D [5]. Heldigvis kan hemmet glukosetoleranse og hyperinsulinemi oppdages mens pasienten er i prediabetes-stadiet. Endringer i kosthold, trening, vekttap og kontrollerte nivåer av plasmaglukose kan dermed hindre at tilstanden utvikler seg og går over i T2D [11].

Prevalensen av T2D er stadig økende. Dessuten er antallet personer med ukjent diabetes også foruroligende høyt. Helsedirektoratet regnet i 2009 med at halvparten av alle personer som lider av T2D er underdiagnostiserte. Følgende kriterier legges til grunn ved diagnostisering av T2D [12].

DIAGNOSTISKE KRITERIER:	VENØS PLASMAGLUKOSE:
Fastende plasmaglukose	≥ 7 mmol/l
og/eller 2 timer etter inntak av 75 g glukose	≥ 11 mmol/l
og/eller tilfeldig P-glukose i kombinasjon med symptomer	≥ 11 mmol/l

Tabell 1.2: Diagnostiske kriterier for T2D. Modifisert fra [12].

Behandlingen av T2D inneholder fire elementer: Kostholdsendring, mosjon og optimalisering av levevaner, medikamenter og motivasjon/undervisning. Tidligere gikk behandlingen hovedsakelig ut på å senke nivået av plasmaglukose, mens nå er også behandling av den økte risikoen for hjerte- og karsykdommer vektlagt. Kostrådene består hovedsakelig av å spise variert og allsidig: mindre mettet fett, sukker og salt, og mer grønnsaker, frukt/bær, grove kornprodukter og umettet fett. Individuelle mål bør settes for vektnedgang, men retningslinjene anbefaler alle med T2D om å oppnå et vekttap på 5-10 % (dersom overvektig i utgangspunktet). Alle som har mulighet til det bør tilstrebe fysisk aktivitet i minst 30 min daglig (rask gange eller tilsvarende aktivitet), og røykeslutt er sterkt anbefalt dersom dette er aktuelt [12].

Medikamentell behandling brukes i tilfeller der kostholdsintervensjon, økt fysisk aktivitet og livsstilsendringer ikke er tilstrekkelig for å oppnå behandlingsmålene. Førstevalget blant perorale antidiabetika er metformin, et biguanidderivat som først og fremst virker ved å redusere leverens glukoseproduksjon. Dersom ikke metformin er tilstrekkelig alene, kan det

suppleres med et sulfonylureapreparat (glipizid, glimepirid, glibenklamid). For pasienter som ikke oppnår behandlingsmålene, eller som opplever forverring av sykdommen, kan tilførsel av insulin (NPH-insulin) være nødvendig. Hypertensjon bør også behandles medikamentelt dersom annen behandling ikke er tilstrekkelig [6] [12].

Alle personer med T2D som er eldre enn 40 år og har serum-LDL-kolesterol $> 3,5$ mmol/l anbefales i tillegg behandling med et statin (simvastatin, atorvastatin, pravastatin etc).

Diskusjonen går stadig om statiner bør være en del av standardbehandlingen for T2D uansett kolesterolnivå og risikograd for hjerte- og karsykdom. Dette på grunn av at statinene er vist å ha en klar beskyttende effekt mot kardiovaskulære lidelser [12] [10].

1.4 Skjelettmuskel

De tverrstripede skjelettmusklene utgjør omtrent 38 % av kroppens totale kroppsmasse for menn og 30 % for kvinner. Hvert menneske har omtrent 640 skjelettmuskler [13] [14], og hovedfunksjonen til disse musklene er å bevege kroppen, kontrollere kroppstillinger, støtte og beskytte innvollene, kontrollere kroppens åpninger, samt bidra til jevn kroppstemperatur. Skjelettmuskelcellene dannes i fosterstadiet. Dette skjer ved at myoblaster (embryonale celler) fusjonerer til muskelceller (myotuber, også kalt muskelfibre). En muskelcelle har derfor mange cellekjerner. Ettersom fosteret og barnet vokser vil muskelfibrenes størrelse øke, og ferdig utviklede muskelfibre har en diameter på 0,01- 0,1 mm og en lengde på noen få centimeter, avhengig av om personen er godt trent eller ikke [15].

1.4.1 Skjelettmuskelens oppbygning og struktur

Alle vertebrater (dyr med indre skjelett med ryggvirvler, inkludert menneske) har samme oppbygning av skjelettmusklene. Skjelettmuskulaturen er bygd opp av muskelceller/muskelfibre (myotuber), bindevev, blodårer og nerver. Mesteparten av muskelfibrene består av myofibriller, som er tynne, sylindriske strukturer som går gjennom hele muskelfiberen fra den ene enden til den andre. Disse myofibrillene består igjen hovedsakelig av to typer myofilamenter, som er tynne tråder bygd opp av proteinene myosin og aktin. Myosinfilamentene er de tykkeste. Aktin og myosin følger et fast mønster som gjør at skjelettmuskelen får det karakteristiske tverrstripede utseende. Glatte muskelceller har ikke et slikt karakteristisk mønster. Den minste enheten i mønsteret er sarkomeren som består av to

sett aktinfilamenter og ett myosinfilament. Myosinfilamentet er lokalisert mellom de to aktinfilamentene, og sarkomeren er avgrenset av to skillevegger kalt Z-skiver. Hver muskelfiber er omgitt av en tynn bindevevshinne, og grupper av muskelfibere er omgitt av en noe tykkere hinne. I bindevevshinnene går det nerver og blodkar. Hver muskelfiber er omgitt av et nett av kapillærer som sørger for en effektiv sirkulasjon. Kontraksjonen til skjelettmuskelcellene er styrt av det somatisk motoriske nervesystemet, og hver enkel muskelcelle må motta nerveimpulser for å kontrahere [15] [16].

De ulike typer muskelfibre kan deles inn etter evnen til å kontrahere raskt, samt evnen de har til å motstå næringsmangel. Det finnes fire hovedtyper muskelfibre [17]:

- Type I-fibre: Har høy oksidativ kapasitet og kan kontrahere lenge og i mange repetisjoner.
- Type IIa-fibre: Har lavere oksidativ kapasitet, men høyere glykolytisk kapasitet og kan kontrahere raskt. Passer til korte og kraftfulle kontraksjoner.
- Type IIx-fibre: Har omtrent bare glykolytisk kapasitet i menneske og fibreene er sensitive for næringsmangel. Kan imidlertid kontrahere meget kort og kraftig. I gnagere er disse fibreene mer oksidative.
- Type IIb-fibre: Finnes bare i gnagere og tilsvarer type IIx-fibre hos mennesker.

1.4.2 Skjelettmuskulens kontraksjon

Skjelettmuskulens kontraksjon styres av det somatisk motoriske nervesystemet. Det betyr at skjelettmuskulene er underlagt viljestyrt kontroll. Grunnlaget for kontraksjonsmekanismen ligger i organiseringen av aktin- og myosinfilamentene. Aktinfilamentene har et bindingssete for myosinhodene, og når myosin binder seg til aktinfilamentene og utøver kraft på dem vil vinkelen mellom myosinfilamentene og myosinhodene forandres. Når et aksjonspotensial sprer seg gjennom skjelettmuskelen begynner hodet på myosinet å bevege seg langs aktinfilamentet. Dette skjer i gjentatte sykluser hvor myosinhodet binder og hydrolyserer ett ATP-molekyl i hver syklus. Muskelen kontraherer fordi myosinfilamentene blir forskjøvet i forhold til hverandre og overlappingen mellom aktin- og myosinfilamentene øker (sarkomeren forkortes). Når kontraksjonen er over mister myosinhodet kontakten med aktinfilamentet og muskelen hviler. Denne kontraksjonsmekanismen er aktiv (forbruker

energi) og kalles *konsentrisk kontraksjon*. En muskelfiber kan bare forkortes aktivt, aldri forlenge seg [15] [16].

1.4.3 Satelittceller

Satelittceller er en gruppe myogene stamceller i skjelettmuskelceller [18]. Cellene befinner seg under muskelfiberens basallamia tett opptil muskelfiberens plasmamembran [19]. Disse cellene ble først oppdaget i 1961 av Alexander Mauro, som beskrev satelittceller i froskemuskel [20]. Satelittcellene er ansvarlige og nødvendige for utviklingen og nydannelse av muskelfibre. Under normale fysiologiske forhold ligger disse cellene omtrent i ro, men blir muskelen skadet eller utsatt for annen ytre påvirkning vil satelittcellene bli aktivert. Det er det spesielle mikromiljøet rundt satelittcellene, som blant annet inneholder en rekke stimulerende- og inhibitoriske vekstfaktorer, som styrer cellenes aktivitet. Ved aktivering vil satelittcellene migrere til områder hvor muskelen er skadet og der differensiere til nye myoblaster. Myoblastene vil deretter fusjonere med hverandre eller eksisterende muskelfibre og danne nye muskelceller med flere kjerner. For å opprettholde det nødvendige antallet satelittceller i muskelen finnes det også satelittceller som ikke lar seg differensiere til myotuber, men som i stedet deler seg og blir til nye satelittceller [21].

Isolerte satelittceller er kapable til å proliferere og danne flerkjernede myotuber *in vitro*, og kan derfor brukes til forsøk som involverer skjelettmuskelceller. Cellene kan påvirkes av vekstfaktorer, omliggende celler og vekstmedium, noe som gjør de lette å jobbe med [19].

1.5 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskel utgjør en stor del av kroppens masse og er også hovedansvarlig for kroppens energiomsetning [22]. Skjelettmuskelceller har en karakteristisk evne til å bytte energikilde ut fra tilgangen på næringsstoffer. Ved faste bruker skjelettmusklene hovedsakelig lipidoksidasjon som energikilde, men denne lipidoksidasjonen kan nedreguleres ved økt glukosetilgang og insulinstimulering. Glukseoksidasjonen vil da øke og muskelcellene vil i stedet bruke glukose som hovedenergikilde. Denne byttingen mellom energikilder kalles metabolsk fleksibilitet [23]. Det begrensende trinnet for glukosemetabolisme i skjelettmuskel er transporten av glukose fra blodbanen gjennom plasmamembranen og inn i cellene [24].

1.5.1 Insulinmediert opptak av glukose

Insulin er et peptidhormon som syntetiseres i β -cellene i de langerhanske øyer i bukspyttkjertelen (pancreas). Hormonets hovedoppgaver er å øke opptaket av glukose i muskel- og fettvev, øke intracellulær lagring av glukose i form av TAG og glykogen, samt hemme produksjon og frisetting av glukose (glukoneogenese) fra lever [25]. Insulin består av 51 aminosyrer fordelt på to kjeder (21 aminosyrer i α -kjeden og 20 aminosyrer i β -kjeden) bundet sammen av to disulfidbroer. Frisettingen av insulin fra pancreas skjer først og fremst som en respons på økt glukosenivå i plasma. Insulinresponsen trigges både av inntak av næringsstoffer og av gastrointestinale peptidhormoner [11]. Etter frisetting fra pancreas fraktes insulin via blodbanen til vevet og medierer der opptak av glukose fra plasma. Reguleringen av glukoseopptaket skjer gjennom aktivering av en rekke intracellulære proteiner i skjelettmuskelcellene. Opptaket av glukose skjer via GLUT-proteiner, som er transmembrane glukosetransportører lokalisert i myotubenes plasmamembran [22]. Det er beskrevet 15 ulike GLUT-proteiner i vev fra pattedyr, hvorav minst fem isoformer uttrykkes i humane skjelettmuskelceller hos voksne personer (GLUT1, GLUT4, GLUT5, GLUT8 og GLUT11) [24]. GLUT1 er den isoformen som står for basaloopptaket av glukose, mens GLUT4 er den dominerende glukosetransportøren i skjelettmuskel og står også for insulinmediert glukoseopptak. Vanligvis lagres GLUT4 intracellulært, og translokeres til cellemembranen som respons på insulin [26]. Når insulin binder seg til α -subenheten på insulinreseptoren i cellenes plasmamembran, vil tyrosinkinaseaktiviteten i reseptorens intracellulære β -subenhet øke. Dette fører igjen til autofosforylering av insulinreseptoren og til tyrosinfosforylering av insulinreseptor-substrat-1 (IRS-1). Fosforylert IRS-1 kan deretter binde seg til den p85-regulerende subenheten på fosfatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), som så aktiverer den katalytiske subenheten p110 på dette enzymet. Katalytiske produkter av PI3-kinase aktiverer deretter fosfoinositidavhengige kinaser (PDK), som igjen virker på ulike kinaser nedstrøms. To av disse kinasene er Akt/PKB og Akt/PI3. Aktivering av Akt/PKB og Akt/PI3 fører umiddelbart til translokering av GLUT4 til cellemembranen og t-tubuli, noe som tvinger cellene til å øke opptaket av glukose [22] [10].

1.5.2 Kontraksjonsmediert opptak av glukose

Translokasjon av GLUT4 til cellemembranen og t-tubuli må ikke stimuleres av insulin, men kan også stimuleres av muskelkontraksjoner alene [22] [26]. Insulin og muskelkontraksjoner

bruker ulike intracellulære signalveier for å stimulere til GLUT4-translokasjon og økt glukoseopptak. 5'-adenosin monofosfataktivert proteinkinase (AMPK) har en viktig rolle i kontraksjonsmediert stimuli. AMPK er et enzym bestående av én katalytisk subenhet ($\alpha 1$ eller $\alpha 2$) og to regulatoriske subenheter ($\beta 1$ eller $\beta 2$ og $\gamma 1$, $\gamma 2$ eller $\gamma 3$), og det fungerer som en intracellulær energisensor. AMPK aktiveres som respons på ulike fysiologiske prosesser, inkludert prosesser som endrer den intracellulære AMP/ATP-ratioen (hypoxia, mangel på glukose) og Ca^{2+} -konsentrasjonen (trening), samt hormoner, cytokiner og adipokiner. Selve aktiveringen av AMPK skjer via to distinkte signaler: en Ca^{2+} -avhengig signalvei mediert av CaMKK β , og en AMP-avhengig signalvei mediert av LKB1. Begge signalveiene fører til fosforylering av Thr172 på α -subenheten [27] [28]. Binding av AMP til γ -subenheten fører til en allosterisk regulering av AMPK og fosforylering av AMPK via AMPK-kinase (AMPKK) [29]. Resultatet av AMPK-aktivering er økt glukoseopptak, glykolyse, fettsyreoksidasjon og mitokondriell biogenese, samt nedsatt proteinsyntese, glykogensyntese, glukoneogenese og syntese av kolesterol/FFA [27]. Denne kontraksjonsmedierte prosessen er uavhengig av insulin fordi kontraksjon ikke fører til autofosforylering av insulinreseptoren. Aktivering av AMPK og translokasjon av GLUT4 uavhengig av insulin skjer for å møte den kontraherende muskelens økte behov for næring. Trening og fysisk aktivitet resulterer i mange fordelaktige prosesser i skjelettmuskel, inkludert oppregulering av GLUT4-ekspresjonen, translokasjon av GLUT4 og en økt sensitivitet for insulin. Disse effektene kan vare i mange timer etter at treningen er over. Dessuten vil tilstrømningen av blod til muskelen øke under trening, slik at tilgangen til ulike næringsstoffer øker. Mange studier har vist at trening og fysisk aktivitet gir bedre kontroll av plasmaglukosenivåer i pasienter med diabetes mellitus [30].

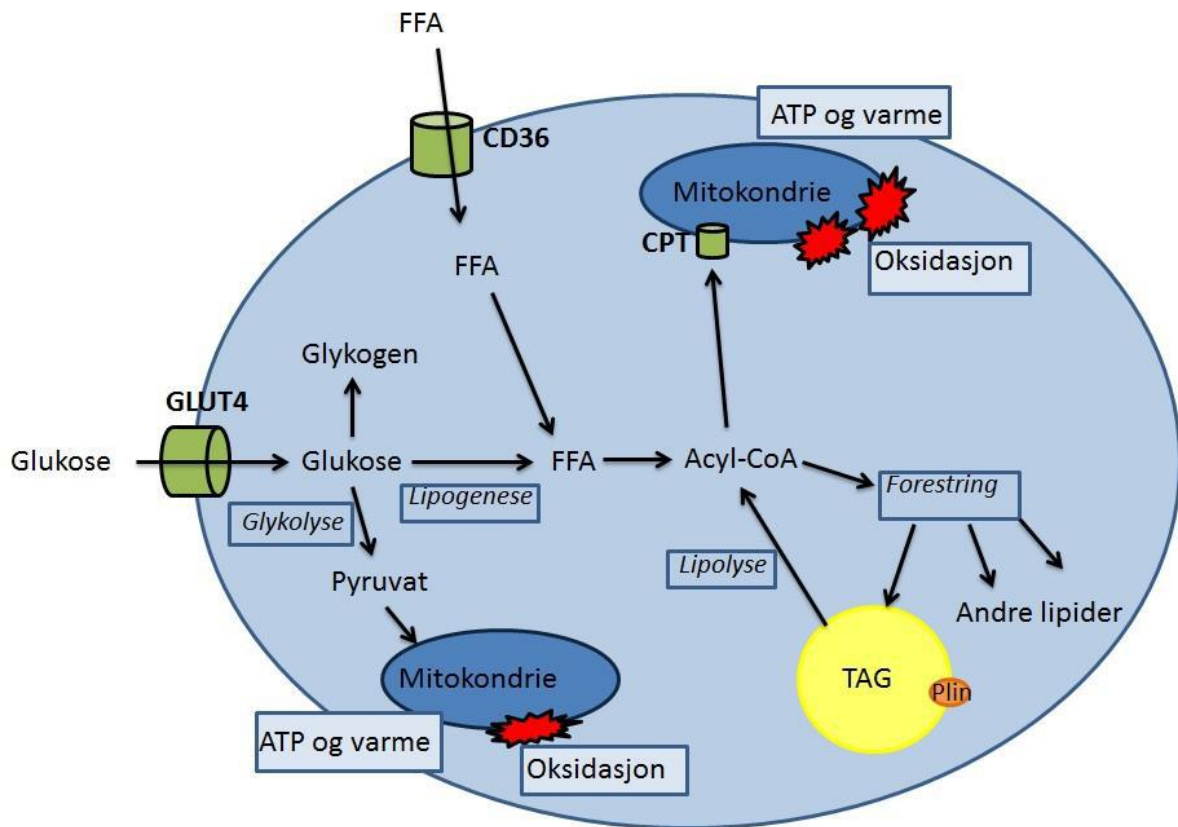
1.5.3 Oksidasjon av glukose og glykolyse

Omgjøring av glukose til ATP, som cellene kan benytte seg av, kalles glykolyse. Dette er en prosess som starter med at glukose fosforyleres til glukose 6-fosfat like etter opptak til cellen via GLUT4-transportører (se avsnitt 1.5.1 og 1.5.2), og som resulterer i produksjon av ATP og NADH. Fosforyleringen til glukose 6-fosfat skjer via enzymet heksokinase. Glykolysen foregår i cytosol og involverer i alt 10 ulike reaksjoner i serie. I hver enkelt reaksjon blir det produsert et sukkerintermediat, som videre katalyseres av spesifikke enzymer. Selv om det forbrukes to ATP-molekyler til å drive de tidlige trinnene i glykolysen er nettoproduksjonen fire ATP-molekyler og to NADH-molekyler. NADH kan videre gå inn i cellenes elektrontransportkjede. I elektrontransportkjeden blir ATP produsert fra ADP og P_i ved hjelp

av oksidativ fosforylering av NADH til NAD^+ og dannelsen av H_2O . Denne prosessen forbruker molekylært oksygen (O_2), i motsetning til glykolysen. Pyruvatmolekylene som produseres i glykolysen transporteres inn i mitokondriene hvor de dekarboksyleres av pyruvat dehydrogenasekomplekset (PDK), et kompleks som består av tre ulike enzymer. Produktene fra dekarboksyleringen er ett NADH-molekyl, acetyl-CoA, samt CO_2 . CO_2 er et avfallsstoff som seinere fraktes ut av cellen til blodbanen, diffunderer ut i lungene og pustes ut. Acetyl-CoA kan videre bli oksidert i TCA-syklus til CO_2 og H_2O samtidig som NADH blir produsert. Dette står for hoveddelen av energiproduksjonen i eukaryote celler. NAD^+ som produseres kan gå inn i glykolysen som energikilde for å holde prosessen gående [31].

1.5.4 Lagring av glukose i cellene

Glukose som skjelettmuskelcellen ikke umiddelbart har brukt for til energiproduksjon blir lagret som glykogen i cellens cytosol [31]. Glykogen er en forgreinet polymer av glukose som kan sees som sfæriske partikler (også kjent som β -partikler med en diameter på 10-45 nm) i elektronmikroskop. Glykogen fungerer som en endogen energireserve for produksjon av ATP, og nærvær av tilstrekkelige mengde glykogen er viktig for optimal muskelfunksjon. Under arbeid er endogent glykogen hovedenergikilden til skjelettmuskelcellene [17]. Når mer ATP enn det som genereres fra næringsstoffer fra mat er nødvendig, kan energi rekrutteres fra glykogen. Da blir glykogen brutt ned i en reaksjon som produserer glukose 1-fosfat. Glukose 1-fosfat kan videre gå inn i glykolyse, og nytt ATP og NADH blir dannet. Syntetiseringen og degraderingen av glykogen justeres dermed etter cellens behov for energi [31]. Glykogen er en viktig energikilde da energi kan rekrutteres ved fravær av oksygen. Dessuten er glykolytiske enzymer relativt vidt distribuert gjennom hele muskelcellen (spesielt i regioner som krever mye energi), noe som gjør at glykogen kan brytes ned raskt [17].



Figur 1: Energimetabolisme i skjelettmuskel. Glukose som tas opp fra blodet til cellen kan enten lagres som glykogen, oksideres til ATP og varme i mitokondriene eller omdannes til fettsyrer (FFA) via lipogenese. FFA som tas opp fra blodet til cellen blir omdannet til acyl-CoA, som videre enten kan bli oksidert til ATP og varme i mitokondriene, reforestres til andre lipider eller lagres som triacylglycerol (TAG) i lipiddråper (LD). Gjennom lipolysen kan lagret TAG igjen omdannes til acyl-CoA og inngå i energiproduksjonen [32].

1.6 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmusklene er det organet i kroppen som forbruker mest energi, og er sammen med lever og hjertemuskel hovedorganet for oksidasjon av fettsyrer i kroppen. Fett, lagret som triglyserider (TAG) i fettvev og mobilisert fra fettvevet som frie fettsyrer (FFA) i plasma, er kroppens hovedenergikilde og -energireserve. Regulering og endring av fettsyremetabolismen er også relatert til utvikling av kardiovaskulære sykdommer, insulinresistens, type 2-diabetes og fedme [33].

1.6.1 Opptak av fettsyrer fra fordøyelseskanalen

Mennesket får hovedsakelig i seg fett i form av TAG gjennom maten. Når triglyseridene entrer tynntarmen som store lipiddråper vil de møtes av galle fra leveren. Gallesaltene emulgerer fettdråpene og det dannes mindre lipiddråper. Grenseflaten mellom vann og fett vil

nå øke slik at spesifikke lipaser fra pankreas lettere kan komme i kontakt med triglyseridmolekylene og spalte disse. Fra ett triglyseridmolekyl vil det dannes tre molekyler frie fettsyrer (FFAs) og ett molekyl glyserol. De frie fettsyrene vil raskt aggregere til miceller som er små nok til å trenge inn mellom mikrovilli i tarmveggen. Når micellene kommer i kontakt med enterocytene vil de avgi frie fettsyrer og monoglyserider som kan diffundere gjennom tarmveggen via transportproteiner. Inne i enterocytene vil de frie fettsyrene bli reesterifisert til triglycerider, pakket sammen med proteiner og fosfolipider og omdannet til kylomikroner. Kylomikronene entrer først lymfesystemet for deretter å bli fraktet over i sirkulasjonssystemet uten først å gå via leveren [33] [15].

1.6.2 Opptak av fettsyrer til organer og vev

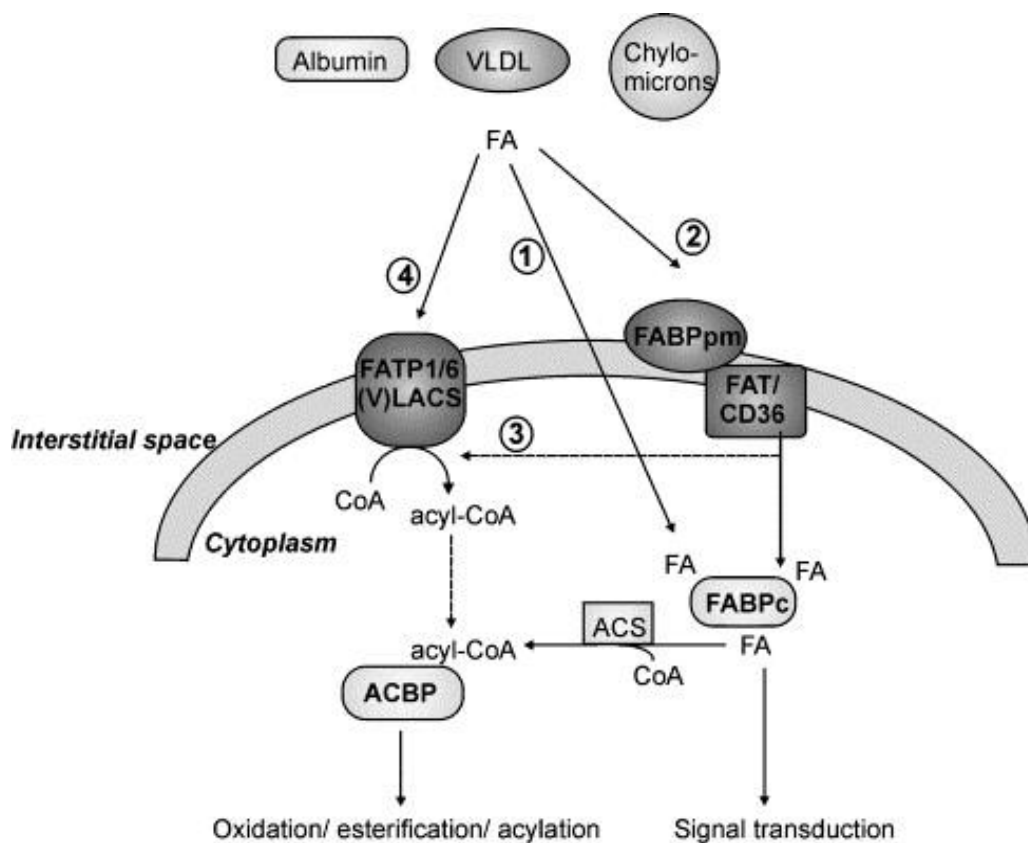
Frie fettsyrer fraktes som sagt i sirkulasjonssystemet pakket som kylomikroner. For at frie fettsyrer skal kunne tas opp til skjelettmuskler, fettvev, lever og hjerte må kylomikronene brytes ned av enzymet lipoprotein lipase (LPL). Dette enzymet finnes hovedsakelig i endotelcellelaget i kapillærer i de nevnte organer og vev. Ved nedbrytning av kylomikroner blir det frigjort frie fettsyrer klare for opptak [33].

Opptak av frie fettsyrer fra plasma til skjelettmuskel og hjertemuskel skjer både via passiv diffusjon og proteinmediert transport over cellemembranen. Plasmamembranen er den siste barrieren fettsyrene må passere før de befinner seg i muskelcellenes cytosol. Fettsyre translokase (FAT/CD36), plasmamembranbundet fettsyrebindende protein (FABPpm) og fettsyre transport protein (FATP) er membranassosierte proteiner som er involvert i fettsyreopptak. Av disse er det FAT/CD36 som er best studert [34]. Som en parallell til GLUT4-translokasjon ved glukoseopptak har det blitt vist at både muskelkontraksjoner (trening) og insulinstimulering øker opptaket av frie fettsyrer gjennom translokasjon av FAT/CD36 fra intracellulære lagringsdepoter til cellemembranen. Økt antall FAT/CD36 i plasmamembranen gir økt opptak av frie fettsyrer. Luiken et al. viste insulinets virkning på fettsyreopptak i sine forsøk utført på skjelettmuskelceller fra rotte i 2002 [35]. Det er også foreslått at FAT/CD36 interagerer med FABPpm i cellemembranen, men i stedet for å virke som et normalt transportprotein akselererer komplekset dissosiasjonen av fettsyrer fra plasmaalbumin slik at fettsyrene kan tas opp i cellen. FATP transporterer antakelig fettsyrene direkte gjennom plasmamembranen [34]. Av medlemmene i FATP-familien er det typen FATP1 det finnes mest av i skjelettmuskel og fettvev, og studier har vist at også denne

transportøren translokteres til cellemembranen som respons på insulin [36]. Jeppesen et al. viste i 2009 at muskelkontraksjon fører til translokasjon av både FAT/CD36 og FABPpm til cellens plasmamembran. Dette studiet ble utført på rotte. I studien ble AMPK-aktivatoren AICAR brukt, og resultatene viste at innholdet av FAT/CD36 i plasmamembranen økte i nærvær av dette stoffet. Dette gjaldt ikke for FABPpm. Dette tyder på at AMPK-aktivert er involvert i kontraksjonsmediert translokasjon av FAT/CD36 [37].

1.6.3 Fordeling av fettsyrer i cellene

Fettsyrer som tas opp fra blodet transporteres videre intracellulært bundet til fettsyrebindende proteiner i cytosol (FABPc). FFA blir deretter aktivert av acyl-CoA syntetase til langkjedet acyl-CoA. Acyl-CoA kan fraktes videre gjennom cellen via acyl-CoA bindende protein (ACBP) [34]. Målet for denne transporten er som regel mitokondrier og peroksisomer hvor acyl-CoA kan gjennomgå β -oksidasjon (se avsnitt 1.6.4.) og danne ATP og varme. Hvis mengden FFA tatt opp til cellen overstiger cellens energibehov kan acyl-CoA i stedet fraktes til endoplasmatisk retikulum (ER). Her vil acyl-CoA bli reforestret til ulike typer lipider som triacylglycerol (TAG), fosfolipider og kolesterylester. TAG og kolesterylester kan så lagres i lipiddråper (LD) i cellens cytosol og fungere som et intracellulært depot av energi [38].



Figur 2: Skjematisk presentasjon av opptak av fettsyrer til skjelett- og hjertemuskulatur. 1: Passiv diffusjon. 2: Det er foreslått at interaksjon mellom FAT/CD36 og FABPpm aksellererer dissosiasjonen av langkjedede fettsyrer fra albumin. 3: Det er også foreslått at FAT/CD36 interreagerer med FATP for økt opptak av fettsyrer. 4: Alternativt har det blitt foreslått at FATP transporterer langkjedede fettsyrer direkte gjennom plasmamembranen. Inne i cellene bindes fettsyrene til FABPc. FFA blir deretter aktivert av acyl-CoA syntetase til langkjedet acyl-CoA. Acyl-CoA kan fraktes videre gjennom cellen via ACBP. Hentet fra [34].

1.6.4 Omgjøring av fettsyrer til energi

Transport over mitokondriemembranene

For å kunne bli omgjort til energi og varme må langkjedet acyl-CoA passere både den ytre og den indre membranen i mitokondriene. Dette foregår ved hjelp av et karnitinavhengig transportsystem som består av tre enzymer: Karnitinpalmitoyltransferase-1 (CPT-1), karnitintranslokase (CAT) og karnitinpalmitoyltransferase-2 (CPT-2). CPT-1 i den ytre membranen omdanner langkjedet acyl-CoA til acylkarnitin. Acylkarnitin transporteres deretter over den indre membranen av CAT, mens CPT-2 konverterer acylkarnitin tilbake til langkjedet acyl-CoA når mitokondrienes matrix er nådd [39] [40]. Det er CPT-1 som er det hastighetsbestemmende trinnet i prosessen og som regulerer fluksen av fettsyrer inn i mitokondriene avhengig av muskelcellens behov [40]. CPT-1-aktiviteten inhiberes av malonyl-CoA under fysiologiske betingelser. Malonyl-CoA dannes i kroppen som respons på inntak av karbohydratrik mat [41].

β-oksidasjon.

Inne i mitokondriene vil langkjedet acyl-CoA gjennomgå en prosess kalt β-oksidasjon. I denne prosessen blir acyl-CoA oksidert via en serie reaksjoner katalysert av fire ulike enzymer, som alle virker på CoA. For hver syklus blir fettsyrekjeden kortet ned med to karbonatomer fra karboksylenden, og det genereres ett molekyl acetyl-CoA, ett molekyl NADH og ett molekyl FADH₂. Acetyl-CoA dannet under β-oksidasjonen kan gå videre inn i TCA-syklus (også kalt sitronsyresyklus eller Krebs syklus) hvor resten av karbonatomene i acetyl-delen av molekylet oksideres og konverteres til CO₂ [31]. β-oksidasjon stimuleres når blodkonsentrasjonen av glukose er lav. Den fysiologiske reguleringen av mitokondriell β-oksidasjon avhenger delvis av organet som har økt energibehov. For eksempel har leveren høy kapasitet for β-oksidasjon og ketogenese, samt lipogenese og esterifisering av FFA. Etter et måltid vil β-oksidasjon her bli undertrykt av malonyl-CoA. I skjelettmuskel og

hjertermuskel, hvor det ikke foregår noen aktiv lipogenese, vil graden av β -oksidasjon avhenge av muskelcellens arbeidsbelastning og behov for ATP [41].

TCA-syklus (sitronsyresyklus, Krebs syklus)

TCA-syklus i mitokondriene begynner med at acetylgruppen fra acetyl-CoA overføres til oxaloacetat, som videre omdannes til en trikarboksylsyre med seks karbonatomer kalt citronsyre (derav navnet på syklusen). Citronsyremolekylet blir deretter gradvis oksidert i en kjede av åtte ulike reaksjoner. Reaksjon nummer åtte regenererer oxaloacetat, som igjen kan omdannes til citronsyre. Til sammen danner disse reaksjonene en syklus. Hver omgang av TCA-syklus danner energirike molekyler som kan brukes i mitokondrienes elektrontransportkjede (ETC) for å produsere ATP til bruk i cellen. Netto energiresultat av én TCA-syklus er tre molekyler NADH, ett molekyl guanosin trifosfat (GTP) og ett molekyl FADH_2 [31].

Oksidativ fosforylering

Omdanningen av NADH og FADH_2 til ATP via ETC er en prosess kalt oksidativ fosforylering. I denne prosessen blir overskudds-elektronene NADH og FADH_2 har tilegnet seg ved å oksidere andre molekyler overført til en kjede av elektronakseptorer og -donorer i mitokondrienes indre membran. Elektronene vandrer gjennom ETC til stadig lavere energitilstander, og energien som frigjøres blir brukt til å drive protoner (H^+) over den indre membranen i mitokondriene. Dermed dannes det en elektrokjemisk gradient over denne membranen, noe som brukes til å drive energikrevende reaksjoner, som fosforylering av ADP til ATP, som cellen kan nyttegjøre seg av. Til slutt i ETC reduserer elektronene O_2 til H_2O . De har dermed nådd sitt laveste energinivå og all tilgjengelig energi fra FFA har blitt ekstrahert via oksidasjon [31].

Lipolyse

Ved økt behov for energi vil kroppen mobilisere fettsyrer fra fettvev og lipiddråper. Denne prosessen kalles lipolyse. Prosessen starter med binding av adrenalin og noradrenalin fra blodbanen til β -adrenerge reseptorer på cellens overflate, noe som fører til aktivering av enzymet adenylsyklase (AC). Aktivert AC vil katalysere dannelsen av syklisk adenosinmonofosfat (cAMP) fra ATP intracellulært. cAMP vil videre aktivere enzymet proteinkinase

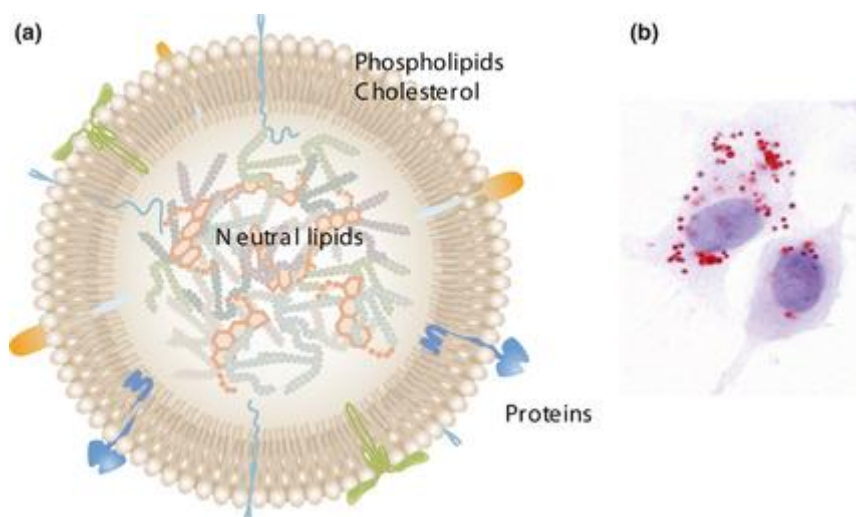
A (PKA), som igjen fosforylerer enzymet hormonsensitiv lipase (HSL) som befinner seg i cellens cytosol. I tillegg vil PKA fosforylere proteinet perilipin 1 (PLIN1, se avsnitt 1.6.6) som er med på å coate lipiddråpenes overflate. Fosforylering av PLIN1 fører til endret proteinsammensetning på LDs overflate slik at HSL kan binde seg til LD og hydrolysere lagret TAG til frie fettsyrer [42] [43]. De frie fettsyrene som dannes kan videre aktiveres av acyl-CoA syntetase til langkjedet acyl-CoA, fraktes til mitokondriene og omdannes til energi cellen kan benytte seg av.

Det hastighetsbestemmende enzymet i lipolyse er HSL. HSL hydrolyserer to fettsyrer fra glyserol-backbone, mens den tredje fettsyren hydrolyseres av monoglyserol lipase. Aktiviteten av HSL reguleres av fosforylering/defosforylering, for eksempel når adrenalin binder til β -adrenerge reseptorer på cellens plasmamembran [33].

Lipolysen kan hemmes av insulin, som ved å binde seg til cellen aktiverer fosfodiesteraser (PDE). PDE vil bryte ned cAMP til 5'-adenosinmonofosfat (5'-AMP), og man mister dermed aktiveringen av PKA og fosforylering av HSL, noe som regnes for å være det hastighetsbestemmende trinnet i lipolysen. I tillegg vil lipolysen også hemmes av ligander som binder seg til α_2 -adrenerge reseptorer og adenosin A1-reseptorer på cellens overflate [43].

1.6.5 Lipiddråper

Skjelettmuskelceller lagrer også fett. I disse cellene lagres fett enten som TAG i lipiddråper (LD) eller som intermediater av FFA (langkjedet fri fettsyre-CoenzymA (LCFA-CoA, DAG eller ceramider). Lipiddråper er dynamiske organeller i cytosol, og finnes i varierende størrelse i de fleste eukaryote celler. Disse organellene består av en kjerne med nøytrale lipider (hovedsakelig TAG, men også sterolestere, retinolestere og fritt kolesterol dannet i ER) omgitt av et monolag av fosfolipider og en proteinkappe av LD-assosierte proteiner (Plin proteiner, se avsnitt 1.6.6.). LD er cellens intracellulære lipidreservoir. Fettet som lagres i disse organellene blir brukt som byggesteiner til membraner og som substrater til energimetabolisme [44] [45]. LD inneholder også enzymer som adipose triglyserid lipase (ATGL) og hormonsensitiv lipase (HSL) som fremmer hydrolyse av triglyserider for å generere fettsyrer [46].



Figur 3: Lipiddråper: (A): Skjematisk oppbygning av LD; struktur og organisering. (B): Bilde av intracellulære LD farget med Oil Red O. Hentet fra [46].

Lipiddråper dannes i cellenes ER, hvor enzymene som syntetiserer nøytrale lipider er lokalisert, men den eksakte mekanismen for dannelse av LD er foreløpig ukjent. Mange proteiner assosiert med ER har blitt linket til LD-dannelse, bl.a. ADP riboksyleringsfaktor (ARF-)-avhengig adaptorprotein coat protein 1 (COP1) som er involvert i trafficking, fosfolipase D1 (PLD1) som katalyserer dannelsen av fosfatsyre, ekstracellulær signalregulert kinase 2 (ERK2) og fat storage-inducing transmembrane (FIT) protein 2, men hvordan disse påvirker dannelsen av LD er ikke vist. En av hypotesene om LD-dannelse går ut på at nøytrale lipider akkumulerer mellom fosfolipidlagene i ER, og at LD avsnøres fra disse (budding) [46].

1.6.6 Perilipinene (PLIN-familien)

De best karakteriserte LD-assosierte proteinene er perilipin- (PLIN) familien. Denne proteinfamilien består av fem strukturelt relaterte proteiner: Perilipin 1 (PLIN1), perilipin 2 (PLIN2, adipophilin and adipose differentiation-related protein [ADRP]), perilipin 3 (PLIN3, tall-interacting protein, 47 kDa [TIP47]), perilipin 4 (PLIN 4, adipocyte protein S3-12) og perilipin 5 (PLIN5, OXPAT, lipid droplet storage protein 5 [LSDP5]). Studier har vist at LD-assosierte proteiner er med på å mediere LD-dynamikk, inkludert syntese av nye LD, vekst og fusjon, intracellulær transport, organelleinteraksjoner, nedbrytning og lipolyse [47].

PLIN1 finnes hovedsakelig i adipocytter. Proteinet eksisterer i tre isoformer (A, B og C), hvor A-isoformen er det mest vanlige [46]. I fettvevet befinner PLIN1 seg på LDs overflate, hvor

det er med på å regulere både basal og hormonelt stimulert lipolyse. Dette skjer ved at PLIN1 regulerer LDs tilgang på lipolytiske enzymer fra cytosol som en respons på fettvevets metabolske status. Under basalforhold vil PLIN1 fremme lagring av TAG i LD fordi tilgangen på lipolytiske enzymer blokkeres, mens ved energimangel vil PLIN1 bli fosforylert av cAMP-avhengig protein kinase A (PKA) og sette i gang maksimal lipolyse via enzymene HSL og fettvevstriglyceridlipase (ATGL) [48].

PLIN2 finnes i omtrent alle kroppens organer og vev, inkludert skjelettmuskel [49]. Proteinet assosieres alltid med LD, og det degraderes lett ved fravær av nøytrale lipider (dvs. fritt i cytosol). Ekspresjonen av PLIN2 er sterkt relatert til mengden nøytrale lipider som finnes i cellen [50]. Mer om PLIN2 i avsnitt 1.6.7.

PLIN3 kan, i motsetning til PLIN1 og PLIN2, finnes i diffuse mønstre gjennom hele cellens cytosol, hvor det heller ikke degraderes lett. Proteinet lokaliseres i LD i nærvær av økte intracellulære nivåer av fettsyrer [46] [51].

PLIN4 uttrykkes hovedsakelig i hvitt fettvev [46]. Det har blitt foreslått at ikke-lipidholdige pooler av PLIN4 fungerer som reservoar for LD-coatende proteiner, noe som tillater rask pakking av nysyntetiserte triglyserider og maksimal lagring av energi ved tilgang på næring [46] [52].

PLIN5 er hovedsakelig uttrykt i oksidative vev som hjerte, type I-skjelettmuskel, lever og brunt fettvev. Proteinet ser ut til å ha samme beskyttende funksjon mot lipolyse av fett lagret i LD som PLIN1. Overekspresjon av PLIN5 i celler i kultur resulterte i økt akkumulering av triglyserider ved behandling med fettsyrer [46] [53].

1.6.7 Perilipin 2 (PLIN2)

PLIN2 finnes i omtrent alle kroppens organer og vev, inkludert skjelettmuskel [49]. PLIN2 finnes hovedsakelig på overflaten av intracellulære LD, og det er vist at PLIN2 dekker over halvparten (~ 60 %) av overflaten på LD i skjelettmuskelbiopsier fra menneske. Det er også vist at type-I skjelettmuskelceller har høyest innhold av PLIN2 [54]. Proteinets funksjon i skjelettmuskelcellene og andre vev er fortsatt ikke fullstendig kartlagt, men forskning tyder på at PLIN2 har en viktig rolle i energihomeostasen [55] og en rolle i prosessen med opptak av langkjedede fettsyrer fra cytosol til akkumulering og lagring av fett i LD. PLIN2 antas også å

være involvert i lipogenesen [56] [57]. PLIN2 kan også være involvert i reguleringen av LDs lokalisering i cellen [56]. Det er også vist at økt lagring av TAG intracellulært og økt mengde LD i cellen har en sammenheng med økt uttrykk av PLIN2. I skjelettmuskler korrelerer mengden PLIN2 med mengden nøytrale lipider intracellulært, og assosiasjonen med LD øker med økt influks av lipider og økt LD-overflate [57].

Uttrykket av PLIN2 i celler reguleres gjennom en familie av kjernereseptorer kalt peroksisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR). Reseptorene PPAR α , PPAR β/δ og PPAR γ er med på denne vevsspesifikke reguleringen; PPAR α i hepatocytter, PPAR β/δ i keratinocytter og PPAR γ i adipocytter. [57]. Det er funnet at ekspresjonen av PLIN2 kan bli stimulert av binding av PPAR α og PPAR β/δ -ligander [56].

PLIN2 finnes hovedsakelig i type I-muskelfibre [54], altså i den muskeltypen med høyest oksidativ kapasitet. Det er imidlertid funnet forskjeller mellom kjønnene når det gjelder mengden PLIN2-protein i skjelettmuskelcellene. I en studie var innholdet av PLIN2-protein og mRNA signifikant høyere hos kvinner enn hos menn, og det samme gjelder for nivået av IMCL [58]. Dette kan tyde på at PLIN2 har en rolle i lipidakkumulering. PLIN2 antas å være involvert i reguleringsmekanismer som holder nivået av intracellulær FFA lavt, samt koordinering av TAG dannelse, dannelse av LD fra ER og stabilisering og beskyttelse av LD mot lipaser. Alt dette bidrar til å beskytte skjelettmuskelcellen mot lipotoksisitet og insulinresistens. Hovedsakelig skjer dette gjennom redusert dannelse av ceramider, DAG og langkjedet acyl-CoA [47]. Flere studier støtter teorien om at PLIN2 hemmer kontakt mellom lipaser og TAG lagret i LD, og dermed påvirker lipolysen [57]. Intracellulære FFA-nivåer holdes lavt ved å opprettholde balansen mellom dannelsen av intramyocellulære triglycerider (IMTG), lipolyse og oksidasjon [47]. Philips et al. foreslo gjennom sine forsøk at PLIN2 også kan øke skjelettmuskelens oksidative kapasitet ved å fremme transport av FFA til mitokondriene. De viste også at intervensjoner assosiert med økt insulinsensitivitet i menneske, vekttap hos overvektige, ikke-diabetiske personer og behandling av T2D-pasienter med troglitazon eller metformin assosierte med økt nivå av PLIN2 i skjelettmuskel [59].

Sheperd et al. undersøkte hypotesen om at PLIN2 i LD i skjelettmuskler er forbundet med økt forbruk av IMTG i muskelen under trening. Resultatene viste at reduksjonen i IMTG i type I-skjelettmuskelceller under trening med moderat intensivitet henger sammen med forbruket av PLIN2-coatede LD i cellen. Dette støtter teoriene om at PLIN2 regulerer IMTG-metabolismen i myotuber [60].

I en studie av Bosma et al., hvor C2C12-mytotuber og siRNA mediert PLIN2 knock-down (KD) myotuber fra mus ble inkubert med 200 μM av ulike fettsyrer over natt, ble det vist at PLIN2 er essensielt for lagring av TAG i LD. I C2C12-cellene medførte fettsyreinkubasjon en signifikant akkumulering av triglyserider i cellene, samt konsentrasjonsavhengig økt uttrykk av PLIN2. I *PLIN2*-siRNA-KD-cellene ble det ikke observert verken nydannelse av LD eller akkumulering av TAG. Ut fra dette foreslo Bosma et al. at myotubene har økt behov for å oksidere overskuddet av FFA i fravær av PLIN2 fordi FFA ikke lenger lagres effektivt i LD [47].

1.7 Randles syklus: Fettsyrers hemming av glukosemetabolismen

På 1960-tallet foreslo Randle et al. en mekanisme for hvordan fettsyrer kan endre insulinmediert glukoseopptak i skjelettmuskler gjennom en glukose-fettsyre syklus. Disse forskerne inkuberte preparater av rottehjerte med fettsyrer og rapporterte om økte intracellulære konsentrasjoner av glukose 6-fosfat og glukose. Samtidig viste inkubering av diafragma-preparater med fettsyrer økte intracellulære konsentrasjoner av glykogen. Dette var bevis for at økt fettsyreoksidasjon hemmer glukosemetabolismen i muskler. Oksidasjon av fett øker ratioene av $[\text{acetyl-CoA}]/[\text{Co-A}]$ og $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ i cellenes mitokondrier, som videre fører til inaktivering av pyruvat dehydrogenase (PDH). Dette hindrer omdanningen av pyruvat til acetyl-CoA. Videre akkumulering av citrat inhiberer fosfofruktokinase-1 (PFK-1) og intracellulære nivåer av glukose 6-fosfat øker. Økte intracellulære konsentrasjoner av glukose forhindrer videre glukoseopptak, og tilgjengeligheten av lipider som næringskilde genererer metabolske signaler som hemmer bruk av glukose via inhibering av glykolytiske enzymer [61] [2].

Det finnes imidlertid også unntak fra Randles teori. Sidossis og Wolfe undersøkte i 1996 en hypotese om at det motsatte av Randles syklus kan forekomme, altså at økt glukosemetabolisme direkte kan inhibere fettsyreoksidasjon i skjelettmuskler. Ut fra deres eksperimenter konkluderte de med at glukose og/eller insulin direkte kan inhibere fettsyreoksidasjon. De foreslo også at det er den intracellulære tilgjengeligheten av glukose – i stedet for FFA – som bestemmer hvilket substrat som oksideres i humane skjelettmuskelceller [62].

1.8 Insulinresistens

Insulin er det viktigste hormonet for regulering av glukosenivået i plasma (se avsnitt 1.5.1.) Insulinresistens spiller en vesentlig rolle i patogenesen ved tilstander som T2D, metabolsk syndrom og fettlever (ikke-alkoholisk) [2]. Insulinresistens er en metabolsk tilstand hvor fysiologiske konsentrasjoner av insulin gir lavere biologisk respons enn normalt. Ved insulinresistens vil insulinmediert opptak av glukose i perifert vev reduseres, samtidig som frigjøringen av glukose fra leveren vil øke. Resultatet av disse hendelsene er unormalt høye plasmanivåer av glukose. For å kompensere for dette vil kroppen øke frisettelsen av insulin fra β -cellene i pankreas, og man vil også få unormalt høye plasmakonsentrasjoner av insulin, en tilstand som kalles hyperinsulinemi [63]. Dersom denne kompensasjonsmekanismen skulle svikte eller bli redusert vil det føre hyperglykemi og svekket toleranse for glukose (prediabetes). Prediabetes kan videre utvikle seg til T2D [64]. Mekanismene bak insulinresistens er ikke fullstendig klarlagt, men høye nivåer av TAG i blodet og ektopisk lagring av lipider er sterkt forbundet med tilstanden [65]. Fordi skjelettmusklene forbruker 80 % av kroppens glukose etter et måltid er dette vevet viktig i forbindelse med insulinresistens [66].

Insulin er et hormon som fraktes i blodet og binder seg til insulinreseptorer på overflaten av skjelettmuskelcellene. Bindingen av insulin til skjelettmuskelcellene fører til en intracellulær kaskade av ulike fosforyleringer og aktiveringer, som til slutt fører til at glukosetransportøren GLUT4 translokteres fra intracellulære vesikler til cellemembranen (se avsnitt 1.5.1). Ved insulinresistens i skjelettmuskel er det denne insulinreceptor-signalveien som er svekket eller som ikke fungerer [67].

Insulinresistens vil resultere i nedsatt katabolisme av TAG, nedsatt HDL-kolesterol og økt LDL-kolesterol. I enkelte insulinsensitive vev vil hyperinsulinemi føre til økt respons på insulin: I nyrene stimulerer insulin reopptak av Na^+ og vann, og dette kan føre til hypertensjon. I lever vil hyperinsulinemi bidra til økt syntese av TAG, som igjen kan føre til hypertriglyseridemi. I glatte muskelceller i blodårevegger kan insulin bidra til proliferasjon av endotel og utvikling av aterosklerose [63].

1.8.1 Lipidindusert insulinresistens

Overvekt og fedme er tilstander som er sterkt assosiert med insulinresistens og nedsatt glukosetoleranse. Imidlertid er det ofte vanskelig å forske på assosiasjonen mellom FFA og insulinresistens i pasienter med fedme og/eller T2D på grunn av forstyrrende effekter fra andre sykelige tilstander hos pasientene [2]. Ofte har disse pasientene også et stort visceralt fettvev. Først og fremst er dette vevet et lager for kroppens overskudd av energi, men det er også et endokrint organ som produserer og skiller ut proinflammatoriske cytokiner som tumor nekrosefaktor- α (TNF- α) og interleukin-6 (IL-6), hormoner som leptin og andre faktorer som antas å være involvert i utviklingen av insulinresistens [68].

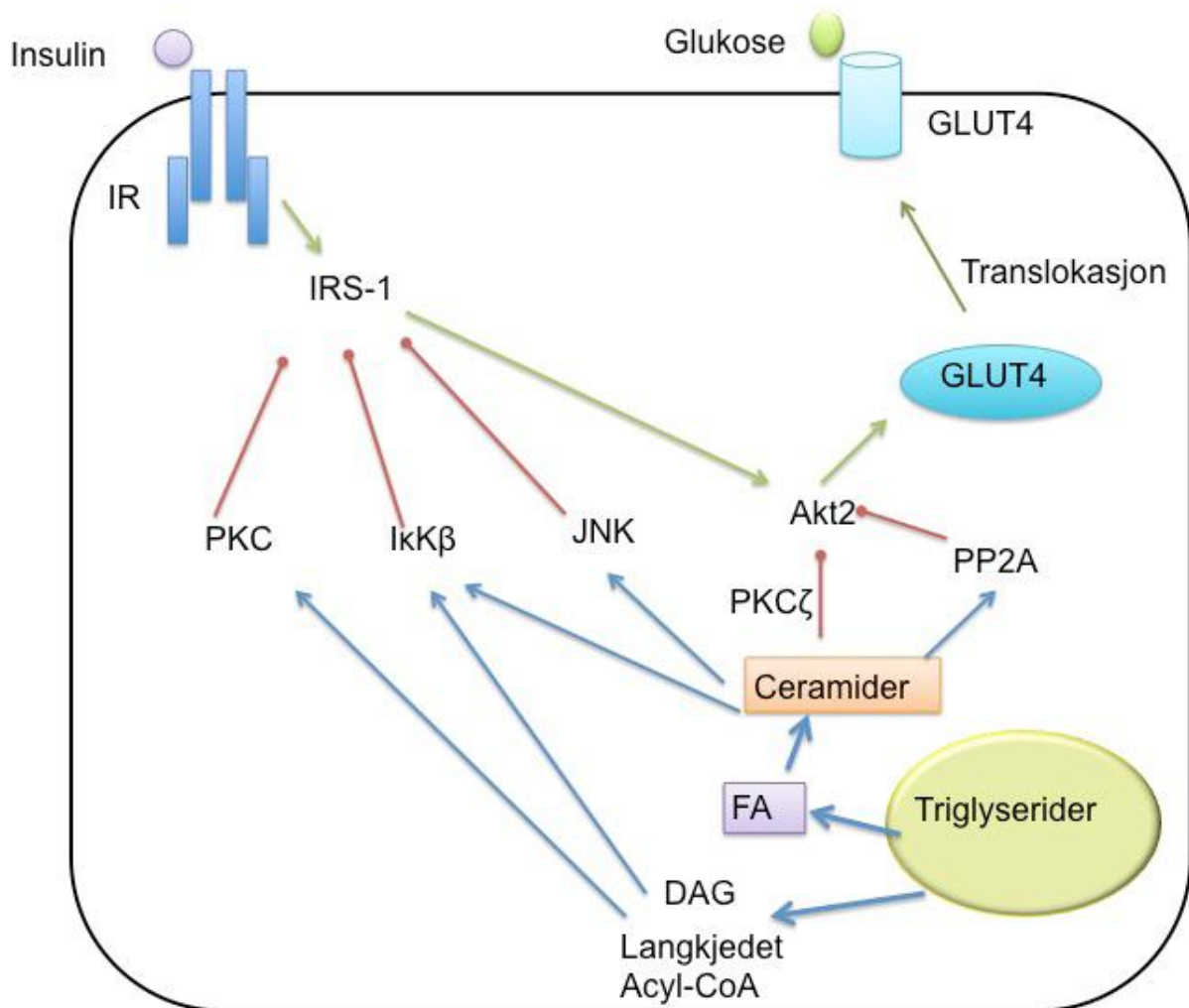
Lipotoksisitet defineres som økte nivåer av lipider og/eller lipidmetabolitter i blod eller vev fulgt av metabolske forstyrrelser [67]. Abnormal ektopisk akkumulering av nøytrale lipider i form av intramyocellulære lipider (IMCL) antas å være en av årsakene til insulinresistens. Ektopisk akkumulering betyr at FFA i overskudd lagres i andre vev enn det hvite fettvevet, slik som skjelettmuskler, hjerte og lever. Disse vevene har normalt sett ingen stor lagringskapasitet for lipider. De lagrede lipidene vil forstyrre lipidhomeostasen og kan føre til lipotoksisitet i vevet [65] [46]. Det viscerale fettvevet vil bidra ytterligere til denne ektopiske lagringen fordi det er hyperlipolytisk og resistent mot insulinets antilipolytiske virkning. Tilgjengeligheten av FFA for skjelettmuskler og lever vil dermed øke [8]. Hva forbinder så lipidakkumulering med redusert insulinaktivitet i muskel? Svaret antas å være relatert til proteinkinase C (PKC) og serin-treonin-kinasene [2]. Forskning har vist at tyrosinfosoryleringen av insulin reseptorsubstrat- 1 (IRS-1) og aktiviteten av fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) er redusert hos personer med overvekt og T2D sammenlignet med friske personer på grunn av økt serin/treonin fosorylering. Reduksjon i tyrosinfosorylering av IRS-1 og IRS-2 har blitt relatert til økt serin/treonin fosorylering av IRS-1 og IRS-2 [67]. Når tilgangen på FFA øker vil også nivået av lipidmetabolitter som diacylglyserol (DAG), ceramider og langkjedet acyl-CoA øke i myotubene [69]. Akkumulering av DAG og langkjedet acyl-CoA kan aktivere PKC [2] og inhibitorisk κ Kinase- β (I κ k- β) og dermed indusere serin/treoninfosorylering av IRS-1. Fosorylering av IRS-1 fører til reduksjon i aktiveringen av PI3K og translokasjonen av GLUT4 hemmes. Dermed hemmes også glukoseopptaket [70].

Hos overvekige pasienter er det funnet høye nivåer av sirkulerende akutfaseproteiner og proinflammatoriske cytokiner. Ut fra dette observerer man ofte en tilstand av kronisk

lavgradsinflammasjon i fettvevet hos disse pasientene. Proinflammatoriske cytokiner og høye nivåer av akutfaseproteiner antas derfor å spille en rolle i utvikling av insulinresistens. Nivået av TNF- α er vist å øke når insulinsensitiviteten i vevet blir redusert. Høye konsentrasjoner av interleukin-6 (IL-6) kan hemme autofosforylering av insulinreseptoren og dermed redusere translokasjon av GLUT4 [71].

Ceramider deriveres fra langkjedede mettede fettsyrer og fungerer som forløper for sphingolipider. Høye nivåer av ceramider har blitt funnet hos overvektige, insulinresistente personer, og man antar derfor at disse spiller en rolle i utviklingen av insulinresistens [67]. Ceramider antas å ta del i en mekanisme som hemmer translokasjon av GLUT4 til cellemembranen. Dette skjer via inaktivering av proteinkinase B β (PKB β /Akt2) gjennom aktivering av proteinfosfatase 2A (PP2A). Ceramider kan også hemme translokasjon av PKB β /Akt2 via hemming av protein kinase C ζ (PKC ζ). Dette kan føre til redusert dannelse av glykogen [72].

Det er også funnet en sammenheng mellom lipid-indusert mitokondriell dysfunksjon og utvikling av insulinresistens og T2D [73]. Ved økt tilgang på FFA vil β -oksidasjonen av langkjedet acyl-CoA til acetyl-CoA øke, men dersom den fysiske aktiviteten ikke økes tilsvarende vil TCA-syklusen forbli redusert på grunn av mangel på intermediater og oksidativt og reduktivt stress. Acetyl-CoA vil dermed akkumulere i mitokondriene, noe som kan føre til at β -oksidasjonen av FFA begrenses eller blir ufullstendig. Dannelsen av metabolske biprodukter fra acetyl-CoA (acylkarnitiner, ketoner, NADH, ROS, RNS) vil også øke og føre til økt redoks press i mitokondriene. Langkjedet acyl-CoA vil i større grad bli lagret som TAG i cellen eller omdannes til DAG og ceramider [74].



Figur 4: Fettsyre (FA)-mediatorer i insulinresistens. Diacylglycerol (DAG), ceramider og langkjedet acyl-CoA er involvert i utviklingen av insulinresistens. Insulinsignalering inne i cellene kan forstyrres av DAG og langkjedet acyl-CoA som aktiverer proteinkinase C (PKC) og inhibitorisk κ kinase- β ($I\kappa K\beta$). PKC og $I\kappa K\beta$ kan indusere fosforylering av insullinreseptorsubstrat 1 (IRS-1), slik at aktivering av proteinkinase B β (PKB β /Akt2) hemmes, og signaler til glukosetransportør 4 (GLUT4)-translokasjon til cellemembranen svekkes. Ceramider er involvert i inaktivering av PKB β /Akt2 både via proteinfosfatase 2A (PP2A) og proteinkinase C ζ (PKC ζ). Dette kan resultere i redusert glukoseopptak til cellene grunnet hemming av GLUT4-translokasjon. Det antas også at ceramider kan hemme IRS-1 gjennom aktivering av $I\kappa K\beta$ og c-Jun N-terminal kinase (JNK) [70] [75].

1.8.2 “Idrettsparadokset”

Selv om mye forskning tyder på en klar sammenheng mellom IMCL og utvikling av insulinresistens hos pasienter med overvekt og T2D, finnes det også forskning som peker i motsatt retning. Hos godt trente idrettsutøvere er det også økte nivåer av IMCL uten at disse personene viser noen form for insulinresistens. Dette refereres til som ”Athlets paradox” eller ”idrettsparadokset” [56]. Forsøk har vist at utholdenhetstrening øker IMCL-nivåer, og godt utholdenhetstrente atleter som er insulinsensitive kan ha IMCL-nivåer høyere enn pasienter

med overvekt og T2D [76]. I tillegg har 12-16 uker med utholdenhetstrening vist å øke insulinsensitiviteten i tillegg til å øke IMCL-nivåer [44]. Dette betyr at assosiasjonen mellom mengden IMCL og insulinresistens muligens kan påvirkes av skjelettmuskelens oksidative kapasitet. Høye konsentrasjoner av IMCL sammen med høy oksidativ kapasitet og insulinsensitivitet hos personer som bedriver jevnlig utholdenhetstrening støtter denne teorien. Mye tyder på at høye nivåer av IMCL alene ikke fører til insulinresistens, men at de lagrede fettsyrene fungerer som en kilde til lipidmetabolitter som videre induserer denne tilstanden [77].

1.9 Substanser benyttet under forsøkene

1.9.1 CAY-10499

CAY-10499 er en potent hemmer av enzymet humant hormonsensitiv lipase (HSL). HSL katalyserer hydrolyse av tri-, di-, og monoacylglyserol, samt kolesterollestere, og er på den måten med på å mobilisere fettsyrer til produksjon av energi. Enzymet uttrykkes hovedsakelig i fettvev, men også noe i skjelettmuskler, hjerte, hjerne, β -celler i pancreas, kjønnsorganer og makrofager [78].

1.9.2 Paraoxone (E600, dietyl *p*-nitrofenylfosfat)

Paraoxone (E600, dietyl *p*-nitrofenylfosfat) er en potent hemmer av enzymet acetylkolinesterase. Dette nevrotoksinet har også en antilipolytisk effekt gjennom en direkte interaksjon med enzymet triglyserid lipase [79]. Stoffet er kjent for å blokkere lipolytisk aktivitet i plasma og har vært brukt til å forhindre hydrolyse av triglyserider i tidligere forsøk. På grunn av sine nevrotoksiske egenskaper må paraoxone håndteres med forsiktighet [80].

1.9.3 Triacsin C

Triacsin C er en kompetitiv hemmer av enzymet acyl-CoA syntetase. Syntetiseringen av acyl-CoA, som kan inngå i β -oksidasjon, vil dermed hemmes. Det er vist i forsøk at triacsin C blokkerer *de novo* syntese av TAG og kolesterollestere, men at det ikke blokkerer resirkuleringen av FFA til fosfolipider [81].

1.9.4 Insulin

Insulin er et peptidhormon bestående av en α -kjede og en β -kjede bundet til hverandre via to disulfidbindinger. Hormonet produseres og frigjøres fra β -celler i de langerhanske øyer i pankreas. Sekresjonen reguleres hovedsakelig av glukosekonsentrasjonen i plasma, men også av tarmhormoner som kolecystokinin (CKK), glukagonlignende peptid (GLP-1), sekretin og gastrisk inhibitorisk peptid (GIP), samt det autonome nervesystemet. Insulinets viktigste funksjoner i energiomsetningen er å stimulere til økt glukoseopptak, økt glykogensyntese, økt triglyseridproduksjon, økt aminosyreopptak og økt proteinsyntese, mens det reduserer glukoneogenesen [15]. I denne oppgaven ble insulin benyttet for å stimulere glukoseopptaket og glykogensyntesen i cellene.

1.10 Hensikt og mål med oppgaven

Hovedmålet for denne masteroppgaven var å studere funksjonen til det lipiddråpeassosierte proteinet PLIN2 i skjelettmuskelceller fra mus, da PLIN2 sin rolle i celler fortsatt ikke er fullstendig kartlagt. Alle forsøkene i oppgaven ble utført i differensierte skjelettmuskelceller (myotuber) *in vitro*.

Funksjonen av PLIN2 ble studert ved å sammenlikne skjelettmuskelceller som har genet som koder for PLIN2 inntakt ($PLIN2^{+/+}$, villtypeceller) med skjelettmuskelceller hvor PLIN2-genet er slått ut ($PLIN2^{-/-}$, knock out celler). Metabolismen av glukose og fettsyre ble studert i nærvær/fravær av PLIN2 ved å følge radioaktivt merkede substrater i myotubene.

Substratmetabolismen ble forsøkt påvirket ved tilsetning av ulike substanser, og effekten av disse ble også sammenlignet mellom $PLIN2^{+/+}$ og $PLIN2^{-/-}$ celler.

Oppsummering av målene for oppgaven:

Identifisere $PLIN2^{-/-}$ myotuber ved kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR) for å verifisere cellemodellen.

Studere myotubenes genekspresjon (mRNA-uttrykk) av ulike gener involvert i energimetabolismen ved qPCR.

Studere opptak av radioaktivt merket glukose i cellene i nærvær/fravær av insulin.

Studere mulige forskjeller i glykogensyntese mellom $PLIN2^{+/+}$ - og $PLIN2^{-/-}$ celler.

Undersøke oksidasjon og akkumulering av radioaktivt merket oljesyre (OA), samt lipolyse, etter 24 timers formerking av myotubene med OA, samt 24-timers og 4-timers behandling med ulike hemmere.

2 Materiale og metode

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Leverandør:	Kjemikalium/reagens:
Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Agilent total RNA isoleringskit
Applied Biosystem, Warrington, Storbritannia	<ul style="list-style-type: none"> High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit SYBR green Master Mix Micro Amp[®] Optical Reaction Plate
BD Biosciences, Bedford, MA, USA	BD Matrigel [™] Matrix
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Tyskland	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
Gibco [®] , Invitrogen (Gibco, Life Technologies), Paisley, Skottland, Storbritannia.	<ul style="list-style-type: none"> Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I 1 g/l glukose) Ham's F10 Glutamax nutrient mixture Føtalt storfeserum (BSA) Penicillin-streptomycin (10 000 IE/ml) Fungizone[®] (250 µg/ml amphotericin B) basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Trypsinløsning (0,25 %) Hesteserum
Invitrogen, USA	Quant-iT [™] RNA BR Assay Kit
Life Technologies, Carlsbad, CA USA	Primere til myotuber fra mus
Lonza, Verviers, Belgia	<ul style="list-style-type: none"> Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) without Ca²⁺, Mg²⁺ and Phenol Red. Phosphate Buffered Saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺.
National diagnostics, Hesse Hull, England, Storbritannia	Ecoscint A Biodegradable Scintillation Fluid
Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Danmark	Actrapid [®] penfill [®] 100 IE/ml (insulin)
Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Primere til qPCR
PerkinElmer Inc., Boston, MA, USA	<ul style="list-style-type: none"> [1-¹⁴C]oljesyre (54,4 mCi/mmol) [¹⁴C(U)]glucose (3 mCi/mmol)
PerkinElmer Inc., Shelton, Scotland, USA	OptiPhase Supermix [®]
Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Tyskland	<ul style="list-style-type: none"> Trypan Blue Solution (0,4 %) Dimetylsulfoksid (DMSO)
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	<ul style="list-style-type: none"> L-karnitin Bovint serumalbumin (BSA) Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrazon (FCCP) HEPES Collagen 1 Oljesyre (OA) Triacsin C Glykogen fra storfelever Nucleic Acid Purification Elution Solution PCR-vann
Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA	Paraoxone (E600)

Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	Pierce ^(R) BCA Protein Assay
VVR, Poole, England, Storbritannia	<ul style="list-style-type: none"> • NaOH • Na₂HPO₂H₂O

Tabell 2.1: Oversikt over benyttede kjemikalier og reagenser.

2.1.2 Utstyr

Leverandør:	Utstyr:
AB Applied Biosystems, Stockholm, Sverige	MicroBeta [®] PLUS, Liquid Scintillation Counter
Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA	Biocoat [®] collagen I Cellware, 12-well plate
Corning Incorporated, Corning, NY, USA	<ul style="list-style-type: none"> • Costar[®] Plate, med lokk (12-, 24- og 96-brønners brett). • Costar[®] stripette (5 ml og 10 ml) • Corning CentriStar[®] sentrifugerør (15 ml og 50 ml). • Corning CentriStar[®] sentrifugerør med skjørt (50 ml).
Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland	Eppendorfrør (Safe-Lock Tubes) 1,5 ml og 2 ml
Gibco [®] Invitrogen, Eugene, OR, USA	<ul style="list-style-type: none"> • Countess[™] automated cell counter. • Countess[™] counting chamber slides
Kubota Corporation, Tokyo, Japan	Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010.
Olympus, Tokyo, Japan.	Olympus CKX41 mikroskop med digitalkamera
PerkinElmer [™] , Shelton, Scotland, USA	<ul style="list-style-type: none"> • Isoplate[™]-96 • TopSeal[®] -A gjennomsiktig film • Unifilter[®] -96 GF/B • Scintiplate[®] -96TC • Wallac Victor³_{TM} 1420 Multilabel Counter.
PerkinElmer, Waltham, MA, USA	Miniature polyethylene vials, 6 ml (tellerør).
Sartorius, Helsinki/Helsingfors, Finland	<ul style="list-style-type: none"> • Optifit Refill Tips, 200 µl • Optifit Refill Tips, 10 µl • Optifit Refill Tips, 1 ml.
Thermo Scientific, Roskilde, Danmark	<ul style="list-style-type: none"> • Reagent reservoirs with dividers (25 ml) • CryoTube[™] Vials (fryserør) • NUNC 75 cm² celleflasker • NUNC 96F untreated straight uten lokk (proteinbrett). • NUNC 96F cellebrett med spiss bunn (ASM-brett).
TPP AG, Sveits	Celleskraper

Tabell 2.2: Oversikt over benyttet utstyr.

2.2 Dyrkning av celler

2.2.1 Karakterisering av celler brukt i forsøk

Til forsøkene i denne oppgaven ble det benyttet satelittceller (se avsnitt 1.4.3.) isolert fra *m. gastrocnemius* fra mus. Cellene kom fra tre ulike donorer, to ulike *PLIN2*^{+/+}-mus (villtype 1 (WT1) og villtype 2 (WT2)) og én *PLIN2*^{-/-}-mus (knock out 5 (KO5)) hvor genet som koder for *PLIN2* er avlet bort. Ved forsøkernes oppstart forelå det ferdig opprensede cellelinjer fra

alle tre donorene, og celler fra disse hadde også vært brukt i tidligere forsøk utført ved avdelingen. Musene som cellene var hentet fra var avlet frem av Dr. philos. Knut Tomas Dalen, Avdeling for ernæringsvitenskap, Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo.

2.2.2 Uttak av celler fra cellebank

Satelittceller fra donorene ble lagret i nitrogetank (-196 °C) og hentet opp for utsåing til forsøk eller oppskalering. I nitrogetanken var cellene lagret i kryorør, og etter uttak ble innholdet i kryorøret raskt tint mellom håndflatene til det nådde en ”slush”-aktig konsistens. Innholdet i røret ble deretter overført til 50 ml sentrifugerør og blandet med 5 ml proliferasjonsmedium (se avsnitt 6.1.1). For å fjerne dimetylsulfoksid (DMSO) fra frysemediet ble cellesuspensjonen så sentrifugert ved 2000 rpm i 5 minutter, hvorpå supernatanten ble sugd forsiktig av med glasspipette og cellepelletten resuspendert i 10 ml proliferasjonsmedium. DMSO må fjernes da høye konsentrasjoner av dette er toksisk for cellene. Etter fjerning av DMSO ble cellene sådd ut på 75 cm² NUNC-flaske med kollagen I coating for oppskalering, eller sådd direkte ut i cellebrett til forsøk (se avsnitt 2.2.6). Cellene ble inkubert i celleinkubator ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.2.3 Høsting av celler til videre utsåing

Etter oppskalering ble cellene på NUNC-flasker høstet for videre utsåing til forsøk. Gammelt medium på flasken ble sugd av med glasspipette før cellene ble vasket med 1 x 5 ml PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺ eller HBSS uten Ca²⁺ og Mg²⁺. PBS eller HBSS ble deretter sugd godt av med glasspipette. Etter vasketrinnet ble 1 ml 0,25 % trypsinløsning tilsatt flasken og den ble inkubert ved romtemperatur i 2-3 minutter. Det ble så kontrollert i mikroskop at cellene hadde løsnet fra underlaget i flasken, eventuelt ble flasken banket godt mellom håndflatene for at cellene skulle løsne. 3 ml proliferasjonsmedium eller vekstmedium (se avsnitt 6.1.2) ble så tilsatt flasken for å inaktivere trypsin. Cellesuspensjonen ble til slutt overført til 50 ml sentrifugerør for telling og fortynning til utsåing.

2.2.4 Telling av celler i suspensjon

Etter høsting av celler fra NUNC-flaske måtte cellene i suspensjonen telles før videre utsåing. 20 µl cellesuspensjon ble tatt ut, overført til eppendorfrør og fortynnet 1:1 med 0,4 % løsning av trypanblått. Løsningen ble så overført til cellekammer og talt i celledellingsmaskin. Alle

cellesuspensjoner ble talt to ganger, og gjennomsnittet av de to tellingene ble brukt i videre utregninger og fortynninger.

2.2.5 Coating av cellebrønner med 2 % matrigel matriks

I forsøk ble cellene dyrket på brett med hhv. 12-, 24- eller 96-cellebrønner. Før utsåing måtte cellebrønnene coates med 2 % matrigel matriks for at cellene skulle feste seg til cellebrønnen. Denne coatingen ble gjort minst 1 time før utsåing til forsøk. Matrigel må oppbevares frosset (-20 °C) og tines over natt i kjøleskap. Dette fordi den raskt danner gel ved romtemperatur. Før coating av cellebrønner ble matrigel fortynnet 1:50 med DMEM-medium uten tilsetninger. Fortynnet matrigel ble så overført til hver cellebrønn i brettet og inkubert ved romtemperatur i ca 1 time, før overflødig matrigel ble sugd av med glasspipette. All jobbing med matrigel matriks foregikk på is for at det ikke skulle dannes gel for raskt.

Type cellebrett:	Mengde matrigelfortynning:
12 brønner	0,5 ml/brønn.
24 brønner	250 µl/brønn.
96 brønner	100 µl/brønn.

Tabell 2.3: Mengde fortynnet matrigel i ulike cellebrett.

2.2.6 Utsåing av celler til forsøk

Cellene ble sådd ut i 12-, 24- eller 96-brønners brett direkte fra NUNC-flaske. Etter høsting (avsnitt 2.2.3) og telling (avsnitt 2.2.4) av cellene ble beregnet mengde celsuspensjon tatt ut og fortynnet med vekstmedium i et nytt 50 ml sentrifugerør. Fortynnet celsuspensjon ble så overført til hver cellebrønn på brettet og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂. Vekstmedium ble skiftet hver 2.-3. dag etter utsåing fram til ca 80 % konfluens. Deretter ble vekstmedium byttet ut med differensieringsmedium (se avsnitt 6.1.3) Dette fikk cellene til å slutte å dele seg og i stedet differensiere fra encellede myoblaster til flerkjernede myotuber, som ble brukt til forsøk.

Det ble jevnt over sådd ut en større mengde *PLIN2 WT1*-celler per brønn enn *PLIN2 KO5*-celler og *PLIN2 WT2*-celler. Dette fordi det viste seg at *PLIN2 WT1*-celler både vokste saktere og differensierte saktere enn cellene fra de andre donorene.

Cellebrett:	Antall (celler/brønn):	Volum (µl/brønn):	Forsøk:
12 brønner	60 000 (WT2, KO5) 70 000 (WT1)	1000 µl	DOG-forsøk qPCR
24 brønner	30 000 (WT2, KO5) 37 000 (WT1)	500 µl	Glykogensyntese- forsøk.
96 brønner NUNC®	10 000 (alle celler)	100 µl	Substratoksidasjon.

Tabell 2.4: Oversikt over utsåing i forskjellige cellebrett.

2.2.7 Nedfrysning av celler til cellebank

Nedfrysning av celler til cellebank ble gjort direkte fra NUNC-flaske. Cellene var klare til nedfrysning da de var ca 80 % konfluente. Man beregner to kryorør nedfrost materiale per 75 cm² NUNC-flaske. Før nedfrysningsprosessen startet ble det laget frysemedium som ble satt i kjøleskap fram til bruk. Dette mediet ble laget nytt for hver nedfrysning da det var viktig at dette var helt ferskt. Gammelt medium på NUNC-flaske ble sugd av med glasspipette før cellene ble vasket med 1 x 5 ml PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺ eller HBSS uten Ca²⁺ og Mg²⁺. PBS eller HBSS ble så sugd godt av med glasspipette. Deretter ble 1 ml 0,25 % trypsinløsning tilsatt flasken, og den ble inkubert i 2-3 minutter, før det ble kontrollert i mikroskop at cellene hadde løsnet fra underlaget. Eventuelt ble flasken banket godt mellom håndflatene for at cellene skulle løsne. 3 ml vekstmedium ble så tilsatt flasken for å inaktivere trypsin, og cellesuspensjonen ble overført til 50 ml sentrifugerør (dersom flere flasker skulle fryses ned ble cellesuspensjonene slått sammen i ett rør). Deretter ble suspensjonen sentrifugert ved 1800 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble sugd av og kastet, mens cellepelletten ble resuspendert i 3 ml iskaldt frysemedium. 1,5 ml cellesuspensjon i frysemedium ble så overført til hvert kryorør, merket med donor- og passasjenummer og gradvis frosset ned ved -20 °C i 30 minutter, deretter – 80 °C over natten før flytting til nitrogentank (-196 °C) etter ca 24 timer.

2.3 Deoksyglukoseopptaksforsøk

Dette forsøket ble utført for å måle insulinstimulert opptak av deoksyglukose (DOG) til *PLIN2*^{+/+}- og *PLIN2*^{-/-}-celler i fravær/nærvær av oljesyre (OA). DOG ble valgt i stedet for glukose, da dette ikke vil bli fosforylert til glukose-6-fosfat i cellene etter opptak og oksidert til ATP i mitokondriene. DOG var radioaktivt merket med ³H for at opptaket skulle kunne måles.

På 3. dag av differensieringstiden ble cellene forbehandlet med hhv. 40 μ M fettsyrefritt bovint serumalbumin (BSA, basalprøve) eller 100 μ M OA (bundet til 40 μ M BSA, ratio 2,5/1).

Forbehandlingen varte i 24 timer, før selve forsøket ble utført på 4. dag av differensieringen.

Forsøket startet med tilsetning av 0,5 ml pre-inkuberingsmedium (DMEM Glutamax, 5,5 mM glukose, 10 μ M BSA \pm 100 nM insulin/brønn) per brønn, før cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 1 time. Deretter ble pre-inkuberingsmediet erstattet med 0,5 ml opptaksmedium (DMEM Glutamax, 5,5 mM glukose, 10 μ M BSA, [³H]deoksyglukose (1 μ Ci/ml) \pm 100 nM insulin) pr. brønn, før cellene på nytt ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 1 time. Etter inkubering ble mediet fjernet og cellene vasket forsiktig med 2 x 1 ml iskald PBS-buffer, før cellene ble lysert med 0,5 ml 0,1 M NaOH. Etter dette trinnet kunne cellene fryses ned ved -20 °C for seinere analyse.

Analysering av prøvene startet med at 300 μ l lysat fra hver brønn ble overført til egne tellerør. Hvert tellerør ble så tilsatt 3 ml Ecoscint A scintillasjonsløsning og analysert på β -teller (1900 TR, Liquid Scintillation Analyze), som talte antall desintegrasjoner per minutt (5 min/prøve). 2 x 50 μ l av de to opptaksmediene ble også overført til tellerør og analysert på samme måte. Dette for å få bestemt den totale radioaktiviteten i forsøksmediene.

2.4 Glykogensynteseforsøk

Dette forsøket ble gjort for å studere mulige forskjeller i glykogensyntese mellom *PLIN2*^{+/+}-celler og *PLIN2*^{-/-}-celler.

På 4. dag av differensieringstiden ble cellene forbehandlet med hhv. 40 μ M BSA (basalprøve) eller 100 μ M OA (bundet til 40 μ M BSA, ratio 2,5/1). Forbehandlingen varte i 24 timer, og selve forsøket ble utført på 5. dag av differensieringstiden. Forsøket startet med tilsetning av 250 μ l forsøksmedium (DMEM Glutamax, D[U-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml), 0,65 mM glukose, 1 mM pyruvat, 10 μ M BSA, \pm 100 nM insulin) pr. brønn, hvorpå cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 3 timer. Etter inkubering ble cellene vasket forsiktig med 2 x 1 ml PBS-buffer. Cellene ble så høstet i 125 μ l dH₂O per brønn og skrapet løs med celledysse. Nå ble også 25 μ l fra hver brønn tatt ut i eppendorfrør til seinere proteinmåling (se avsnitt 2.6). Cellene ble deretter lysert i 100 μ l 60 % KOH per brønn, før brettene ble frosset ned ved -20 °C for seinere analyse.

Analysen startet med at innholdet i hver brønn ble overført til tilhørende eppendorfrør, før hvert rør ble tilsatt 35 µl glykogenløsning (120 mg/ml). Prøvene ble så behandlet på vortex-mikser og inkubert på varmeblokk, 80 °C i 20 min. Etter varmebehandling ble prøvene raskt avkjølt på is (minst 10 min) før glykogen ble felt ut med 1 ml iskald (-80 °C) 100 % etanol pr. prøve. Pipettespissene som ble brukt var også iskalde (-80 °C). Det var viktig at alle løsninger og alt utstyr var iskaldt for å få tilstrekkelig utfelling av glykogen. Etter utfelling ble prøvene sentrifugert ved 10 000 rpm og 4 °C i 20 min., supernatanten ble fjernet og pelleten ble vasket med 1 ml iskald (-20 °C) 70 % etanol, før en ny runde med sentrifugering ved 10 000 rpm og 4 °C i 20 min. ble gjennomført. Etter sentrifugeringen ble supernatanten igjen fjernet og kastet, og pelleten ble lufttørket i romtemperatur i minimum én time før den ble resuspendert i 0,5 ml dH₂O. Prøvene ble så ristet på ristemaskin i 20 min ved romtemperatur før de ble overført til tellerør og tilsatt 5 ml Ecoscint A scintillasjonsløsning. Prøvene ble talt på β-teller (1900 TR, Liquid Scintillation Analyze, 5 min/prøve).

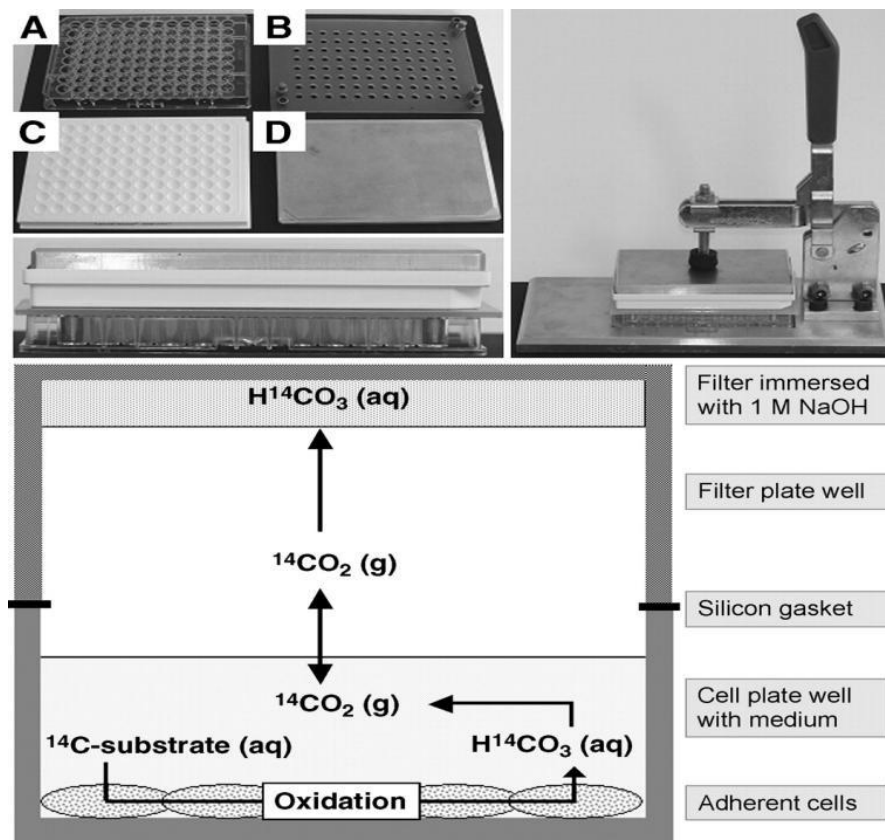
2.5 Substratoksidasjonsforsøk

Substratoksidasjonsmetoden gjør det mulig å måle mengden ¹⁴C-merkede substrater som har blitt oksidert av myotubene. Denne metoden ble først utviklet av Wensaas et al. i 2007, og går ut på å fange opp ¹⁴CO₂ som blir produsert av cellene i løpet av 4-timers inkubering ved hjelp av NaOH og filtere, for deretter å lese dette av på en β-scintillasjonsteller (Wallac MicroBeta[®] PLUS) [82].

I denne oppgaven ble substratoksidasjonsmetoden brukt for å studere opptak og oksidasjon av oljesyre i myotuber fra *PLIN2*^{+/+}- og *PLIN2*^{-/-}-mus i nærvær/fravær av ulike lipasehemmere (ATGL+ HSL-hemmer), HSL-hemmer alene og acyl-CoA syntetasehemmeren triacsin C.

Cellene til forsøkene ble sådd ut på 96-brønners NUNC brett med flat bunn, proliferert og differensiert. På 3. dag av differensieringstiden ble differensieringsmediet fjernet og radioaktivt merket forbehandlingsmedium ble tilsatt. Etter 24 timers forbehandling ble selve forsøket utført på differensieringsdag 5. Trappemedium ble så tilsatt før cellebrettet ble plassert i trappestativet, hvor man lager en slags ”sandwich” (figur 5). Nederst i stativet står cellebrettet med en silikonplate over, stabilisert med metallknotter i hvert hjørne av brettet. Over silikonplaten legges et 96-brønners UniFilter[®]-brett hvor hvert filter er fuktet med 20 µl 1 M NaOH. Filterbrettet er plassert opp-ned, og baksiden av brettet er tettet igjen med en

plastfilm. En tykk metallplate plasseres på toppen før ”sandwichen” klemmes sammen og låses fast ved hjelp av selve trappestativet. ”Sandwichen” er lufttett slik at CO_2 dannet i mitokondriene i cellene fanges opp av NaOH i filterplaten som bikarbonat [82].



Figur 5: Oppsett av trappestativ og prinsipp for substratoksidasjonsforsøk. (A): 96-brønners cellebrett med flat bunn. **(B):** Silikonplate. **(C):** Filterplate. **(D):** Metallplate. $^{14}\text{CO}_2$ som frigjøres ved oksidasjon av ^{14}C -substratet i cellenes mitokondrier fanges opp av NaOH i filterplaten. Bildet er hentet fra [82].

2.5.1 Formerking med radioaktiv oljesyre

I substratoksidasjonsmetoden kan man velge om formerkingssmediet eller selve trappemediet skal være radioaktivt merket. Ved å tilsette radioaktivt merket oljesyre (OA) til differensieringsmediet (=former kingsmedium) dagen før forsøket gjennomføres vil det være OA som er lagret (akkumulert som komplekse lipider) i cellene fra før som blir oksidert. Det var denne forbehandlingen som ble valgt til forsøkene i denne oppgaven. Halvparten av cellene ble forbehandlet med $100 \mu\text{M}$ $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre, mens den andre halvparten ble forbehandlet med $400 \mu\text{M}$ $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre. Trappemediet som ble brukt inneholdt ikke radioaktivt merket OA eller kald (umerket) OA.

2.5.2 Oksidasjonsforsøkene

Oksidasjonsforsøkene ble gjennomført i to separate forsøk med tre paralleller i hvert forsøk. I første forsøk ble cellene behandlet med ATGL-hemmeren paraoxone (Par, 5 μM), HSL-hemmeren CAY-10499 (HSL-h, 10 μM) eller en kombinasjon av disse. Halvparten av cellene ble behandlet med disse stoffene i 24 timer (substans tilsatt i formerkingsmedium), mens den andre halvparten ble behandlet akutt i 4 timer (substans tilsatt i trappemedium, mediet som brukes under trapping av CO_2). I andre forsøk ble cellene behandlet med paraoxone (5 μM), CAY-10499 (10 μM) eller triacsin C (10 μM). Alle cellene ble her akuttbehandlet i 4 timer med disse substansene (tilsatt i trappemedium).

Ved oppstart på forsøksdagen ble først 30 μl formerkingsmedium tatt ut fra hver brønn, overført til ASM-brett med spiss bunn (analyse av syreløselige metabolitter, β -oksidasjonsprodukter av OA, se avsnitt 2.5) og frosset ned ved -20°C . Deretter ble cellene vasket med 2 x 50 μl 0,5 % BSA løst i PBS med Ca^{2+} og Mg^{2+} for å fjerne alle rester av radioaktivitet. Cellene ble så tilsatt trappemedium, montert i trappeapparatet og inkubert i 4 timer, som beskrevet ovenfor. Etter inkubering ble trappeapparatet demontert og 30 μl trappemedium fra hver brønn ble tatt ut og overført til nytt cellebrett (måling av lipolyse, se avsnitt 2.8). Etter fjerning av resten av trappemediet ble cellene vasket med 2 x 150 μl PBS-buffer og lysert i 150 μl 0,1 M NaOH, før brettet ble frosset ned ved -20°C . Filterplaten ble tilsatt 40 μl Optiphase Supermix[®] per brønn, forseglet med Topseal[®]-A gjennomiktig plastfilm, inkubert i romtemperatur i 48 timer og talt i Wallac MicroBeta[®] PLUS.

2.5.3 Måling av celleassosiert radioaktiv oljesyre

Denne målingen ble gjort for å studere en eventuell forskjell i lagringskapasitet av akkumulert oljesyre mellom *PLIN2*^{+/+}-celler og *PLIN2*^{-/-}-celler. Dette kalles celleassosiert radioaktivitet (CA) og undersøkes ved å kvantifisere hvor mye [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-oljesyre som blir akkumulert i cellene i løpet av inkubasjonstiden. Ved å legge sammen mengde OA som ble oksidert i cellene under forsøket ($\text{CO}_2 + \text{ASM}$) og mengde OA som er igjen i cellene etter forsøket, vil man få et mål på total mengde OA som ble tatt opp og omsatt i cellene under forsøket.

Nedfryste cellebrett med lyserte celler ble tint i varmeskap før 50 μl celsuspensjon fra hver brønn ble overført til en 96-brønners Isoplate[®]. Hver brønn ble tilsatt 100 μl Optiphase Supermix[®], og brettet ble forseglet med Topseal[®]-A gjennomiktig plastfilm. Etter 2 timers

henstand ble radioaktiviteten målt ved hjelp av Wallac MicroBeta[®] PLUS. Mengden radioaktivitet som da registreres vil være proporsjonal med mengden OA akkumulert i cellene under forsøket.

2.6 Analyse av syreløselige metabolitter (ASM)

Analyse av syreløselige metabolitter er et mål på β -oksidering av fettsyrer som har skjedd i cellenes mitokondrier. Denne analysen ble gjort med formerkingsmediene fra substratoksidasjonsforsøkene. Fra disse forsøkene ble det tatt ut 30 μ l av formerkingsmediet fra hver brønn som ble overført til 96-brønners NUNC-brett med spiss bunn og frosset ned ved -20 °C. Prøver fra flere forsøk ble samlet opp for seinere analyse. Analysedagen ble brettene først tint i varmeskap før det ble tilsatt 10 μ l 6 % BSA til hver brønn. Deretter ble BSA-fettsyre/lipid komplekser felt ut med 100 μ l 1M HClO₄. Brettene ble så sentrifugert ved 2100 rpm og 4 °C i 10 min. for at utfellingene skulle samle seg som en pellet i den spisse delen av brønnen. Sentrifugering ved lav temperatur hindrer at pelleten reløses i supernatanten. 30 μ l av supernatanten ble så forsiktig tatt ut fra hver brønn og overført til en scintillasjonsplate, før 150 μ l Optiphase Supermix[®] ble tilsatt. Brettet ble forseglet med Topseal[®]-A gjennomskiktig plastfilm og etter henstand ved romtemperatur i minst 1 time ble radioaktiviteten ble målt ved hjelp av Wallac MicroBeta[®] PLUS, telleprotokoll for ASM/lysat (5 min/prøve).

2.7 Proteinmålinger

2.7.1 Bradford-metoden

Måling av mengde protein som befant seg i cellebrønnen etter at cellene var lysert (med 0,1 M NaOH) ble gjort for å kunne framstille resultatene av forsøkene relatert til proteinmengden i hver prøve. I forsøk hvor radioaktivitet måles må radioaktiviteten relateres til antallet celler som befinner seg i hver brønn. Det er imidlertid ikke mulig å telle antallet celler som befinner seg i hver brønn, og i stedet brukes mengde protein pr. brønn. Bradford-metoden var én av metodene som ble brukt til å måle mengde protein, og metoden ble brukt i alle forsøk bortsett fra glykogensynteseforsøket.

Bradford-metoden baserer seg på egenskapene fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 har til å binde seg til aromatiske aminosyrer under sure betingelser. Ved binding til proteiner vil absorpsjonsmaksimum for fargen endres fra 465 nm til 595 nm, noe som kan detekteres ved hjelp av et spektrofotometer. Konsekvensen av endret absorpsjonsmaksimum er fargeendring fra dyp rød til blå, og ut fra blåfargens intensitet kan man estimere mengde protein i prøven ved hjelp av en kjent polynominal standardkurve. Jo mer intens blåfargen er, jo mer protein finnes i prøven [83].

Brettene med lyserte celler ble først tint i varmeskap i ca én time, før 50 µl cellelysatsat fra hver brønn ble overført til 96-brønners NUNC brett med flat bunn. Ved mistanke om høye proteinkonsentrasjoner ble kun 25 µl cellelysatsat overført og deretter fortynnet med 25 µl 0,1 M NaOH. De to første radene i brettet ble brukt til en standardkurve laget av BSA løst i 0,1 M NaOH (0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml og 160 µg/ml), 50 µl pr. brønn. Etter overføring av prøvene ble BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (fortynnet 1:5 i dH₂O) tilsatt, 200 µl pr. brønn. Eventuelle luftbobler ble fjernet for at de ikke skulle påvirke resultatet. Etter henstand ved romtemperatur i 5 min ble absorbansen målt ved 595 nm med Wallac VictorTM spektrofotometer.

2.7.2 Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (BCA-metoden)

For å måle mengden proteiner i hver brønn fra glykogensynteseforsøket ble det brukt et ferdig kit kalt Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay kit. Metoden baserer seg på egenskapene aminosyrene cystein, cystin, tryptofan og tyrosin har til å redusere Cu²⁺ til Cu¹⁺ ved romtemperatur. Ved høyere temperaturer (37 °C – 60 °C) vil også peptidbindinger i proteiner kunne redusere Cu²⁺. Hvert Cu¹⁺-ion vil danne et kompleks med to BCA-molekyler, og man får et lilla-farget produkt som absorberer lys ved 562 nm. Absorbansen kan detekteres ved hjelp av et spektrofotometer, og konsentrasjonen av protein i hver prøve kan beregnes ved hjelp av en kjent standardkurve [84].

Eppendorfrørene med cellelysatsat tatt ut etter glykogensynteseforsøkene ble tint i romtemperatur før 10 µl cellelysatsat fra hver prøve ble overført til et 96-brønners NUNC-brett med flat bunn. De to første radene i brettet ble brukt til standardkurve (0 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml og 1 mg/ml). Telleløsningen i BCA-kitet ble fortynnet 1:50 med BCA-løsningen i kitet. Deretter ble 200 µl fortynnet telleløsning tilsatt

til hver brønn og brettet ble inkubert i varmeskap ved 37 °C og 5 % CO₂ i 30 min før absorbansen ble målt med Wallac VictorTM spektrofotometer.

2.8 Måling av lipolyse

Hensikten med denne målingen var å studere hvor mye fettstoffer cellene har sluppet ut (lipolyse) i løpet av fire timer. Forsøket foregikk på samme måte som substratoksidasjonsforsøkene (med de samme mediene) til trappingen over 4 timer var ferdig. Etter trappingen ble 30 µl av trappemediet tatt ut og overført til CA-brett med flat bunn. Deretter ble 100 µl Optipase Supermix[®] tilsatt i hver brønn og radioaktiviteten ble målt ved hjelp av Wallac MicroBeta[®] PLUS. Radioaktiviteten som måles vil tilsvare det cellene har sluppet ut.

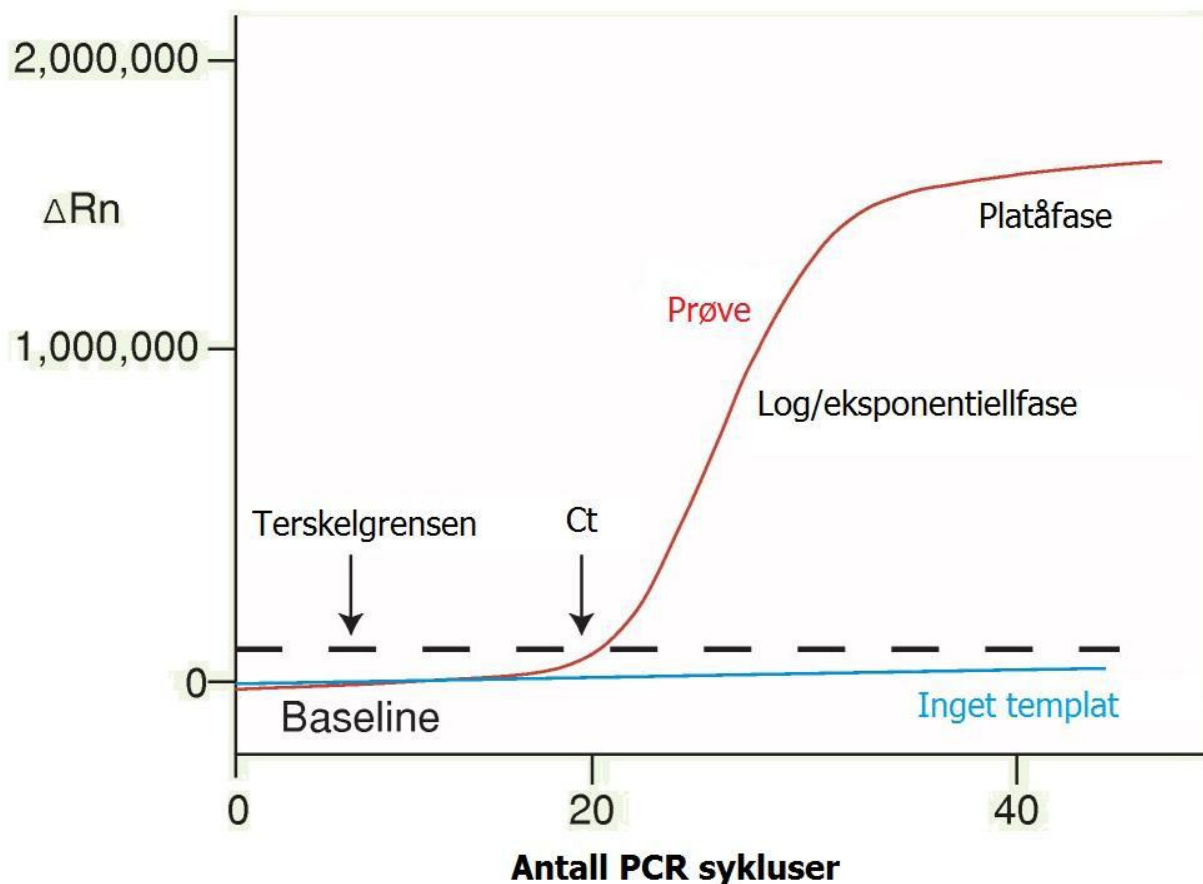
2.9 Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR) er en kvantitativ *in vitro* metode som benyttes til å undersøke endringer i mRNA-uttrykk i celler. Metoden kan også brukes i kombinasjon med enzymet revers transkriptase for å studere komplementært DNA (cDNA, real-time revers transkriptase polymerase-kjedereaksjon). I denne oppgaven ble qPCR benyttet for å undersøke om genet som koder for PLIN2 var tilstede i *PLIN2*^{-/-}-celler, samt om fravær av PLIN2 hadde effekt på uttrykket av andre gener som er viktige i fettsyremetabolismen.

Real-time qPCR er, som andre PCR-teknikker, basert på *in vitro* amplifisering av spesifikke DNA-sekvenser gjennom mange PCR-sykluser. Teknikken er enkel og effektiv og krever ingen form for kloning. For studier av messenger RNA (mRNA) er utgangspunktet for amplifiseringen opprenset mRNA fra lyserte celler, som transkriberes tilbake til komplementært DNA (cDNA) ved hjelp av enzymet revers transkriptase. cDNA er en dobbelttrådet helix som videre brukes som templat for amplifiseringen av DNA. Før PCR-reaksjonen begynner lager man en såkalt reaksjonsmiks som inneholder prøven, primer, dNTP, polymerase og en fluorescerende detektor. PCR-maskinen er programmert til fire forskjellige temperatursteg. Hver PCR-syklus begynner med oppvarming av cDNA slik at helixen denaturerer (separeres) til to tråder. Steg to er avkjøling slik at primeren vil bindes til enkelttrådet DNA (ssDNA). Reaksjonsmiksen varmes så til 72 °C i steg tre slik at DNA

polymerase kan starte elongeringen av en ny DNA-tråd. Når reaksjonsmiksen inkuberes med en spesifikk DNA-polymerase (som gjenkjenner DNA-primeren) vil det bli dannet to nye doble DNA-helixer med cDNA-trådene som templat. De nye helixene blir så varmet opp på nytt (i steg fire) slik at den nye DNA-tråden kan separeres fra den gamle og en ny PCR-syklus kan starte. Hver PCR-syklus vil doble mengden DNA dannet i forrige syklus (eksponentiell vekst). I praksis trengs det 20-30 PCR-sykluser for å danne tilstrekkelig mengde DNA til kvantifisering, og hver syklus tar omtrent 5 min [31] [85].

Real-time qPCR genererer kopier av cDNA eksponentielt på lik linje med vanlig PCR, og slik vil det oppstå et kvantitativt forhold mellom mRNA som var tilstede i de lyserte cellene i utgangspunktet og mengde PCR-produkt som dannes og akkumuleres. For å detektere dette brukes en fluorescerende detektor. Akkumuleringen skjer i tre faser: Baselinje-fasen, log/eksponentiell fase og platåfase (se figur 2.3). I baselinje-fasen er mengden DNA så liten at fluorescensen ikke er detekterbar. Denne fasen varer ofte fra PCR-syklus 3-15. Med utgangspunkt i baselinjen kan man beregne en terskelverdi som kan brukes til å avgjøre om et signal er støy eller et faktisk signal. For å kunne betegnes som et faktisk signal, må signalet være signifikant høyere enn bakgrunnsstøyen. Alle signaler over den satte terskelverdien regnes som ekte signaler. Disse ekte signalene kan videre brukes til å beregne Ct-verdien, som defineres som antallet PCR-sykluser som må til før fluorescensen er høyere enn terskelverdien. Jo flere templatere som er til stede i begynnelsen av en PCR-syklus, jo færre sykluser må til for at Ct-verdien skal nås. I log/eksponentiell fase (over terskelverdien) vil mengden DNA øke eksponentielt uten begrensninger fra reaksjonsparametre. Denne økningen vil holde fram helt til hastigheten synker og platåfasen nås (grafene vil flate ut) pga. at ingrediensene i reaksjonsmiksen tar slutt og fluorescensen mettes [86].



Figur 6: Amplifiseringsplot fra real-time qPCR. ΔRn = Emisjonen fra produktet til enhver tid minus emisjonen fra baselinjen. Ct-verdi: Antall PCR-sykluser før terskelverdien nås. Akkumulering av DNA registreres først når terskelverdien er nådd. Hentet fra [86].

Sybr green

Sybr green er en type fluorescerende detektor, og i denne oppgaven ble Sybr green brukt til å detektere akkumuleringen av PCR-produkt. SYBR[®] green 1 er et fluorescerende molekyl med den egenskapen at det kan interkaleres i doble DNA-helixer. Så lenge molekylet er i ubundet løsning vil det sende ut lite fluorescens, mens det vil sende ut et sterkt signal når det er bundet til dobbeltrådet DNA. Etter hvert som mengden DNA øker under PCR-reaksjonen vil antallet fluorescerende molekyler også øke, og denne økt fluoresceringen brukes til å følge mengden DNA som dannes. Detektoren er mindre spesifikk enn TaqMan-detektoren da molekylet kan binde seg til alt dobbeltrådet DNA som er tilstede (også primer-dimere). Til gjengjeld er den billigere fordi den kan brukes på hvilket som helst primer-par på hvilket som helst target [86].

2.9.1 Høsting av celler til real-time qPCR

PLIN2^{+/+} - og *PLIN2*^{-/-}-celler ble sådd ut på 12-brønners cellebrett coatet med Matrigel, proliferert til ca 80 % konfluens og differensiert i tre dager. På tredje differensieringsdag ble myotubene forbehandlet med 40 µM fettsyrefri BSA (basalprøve), 100 µM oljesyre (bundet til 40 µM BSA, ratio 2,5/1) eller 400 µM oljesyre. Denne behandlingen varte i 24 timer. Etter forbehandlingen ble cellene vasket med enten 1 ml PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺ eller HBSS uten Ca²⁺ og Mg²⁺ pr. brønn, før 500 µl 2 x Nucleic Acid Purification Lysis Solution, fortynnet 1:1 med PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺, ble tilsatt. Cellebrettet ble ristet forsiktig, før innholdet i hver brønn ble overført til tilhørende eppendorfrør og frosset ned ved -80 °C.

2.9.2 Isolering av total RNA fra lyserte celler

RNA ble isolert ved hjelp av instrumentet Applied Biosystem 6100. Det ble brukt et forhåndsinstallert program for RNA-isolering. Celleprøvene ble tint på is før de ble overført til et 96-brønners "RNA purification tray". Prøvene ble så overført til et filterbrett ved hjelp av vakuum. I filterbrettet ble prøvene rensset ved å tilsette vaskeløsninger og filtrere dette i flere omganger. Alt dette skjedde i henhold til programmet for RNA-isolering. Til slutt ble isolert RNA eluert ved å tilsette 150 µl Nucleic Acid Purification Elution Solution (ABI) pr. brønn. Prøvene ble deretter raskt satt på is for at isolert RNA ikke skulle degraderes, før de ble frosset ned ved -80 °C for seinere analyser.

2.9.3 Kvantifisering av isolert RNA

RNA ble kvantifisert ved hjelp av instrumentet NanoDrop 1000 spektrofotometer. Instrumentet ble først kalibrert ved å tilsette 1 µl nukleasefritt vann (blankprøve) til den optiske linsen på instrumentet. Denne dråpen ble så tørket av med tørt papir før prøvene ble påsatt på samme måte. Ved påsetting måtte prøvene være homogene. I den optiske linsen vil væsken bli dratt mellom de to overflatene, og målingen skjer gjennom væsken. Resultatet av målingen kunne enkelt leses av på instrumentets skjerm.

2.9.4 Syntese av cDNA

Komplementært DNA (cDNA) ble syntetisert fra mRNA ved bruk av High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit fra Applied Biosystems (ABI, #368814). Det nødvendige volumet

av hver prøve (500 ng mRNA/reaksjon) ble beregnet basert på kvantifiseringen av RNA. Deretter ble mengden PCR-vann som trengtes for å fortynne hver prøve til et sluttvolum på 10 µl beregnet. Man laget så en reaksjonsmiks bestående av følgende komponenter (oppskrift til én brønn):

Reagens:	Volum:
5 x reaction buffer	4 µl
0,1 M DTT	1 µl
50 µM random hexamers	1 µl
10 mM dNTPs	1 µl
SuperScript III enzyme	0,25 µl
H ₂ O	2,75 µl
Totalt volum	10 µl

Tabell 2.5: Oppskrift på reaksjonsmiks, cDNA-syntese.

Beregnet mengde PCR-vann, 10 µl reaksjonsmiks/brønn og beregnet mengde mRNA-prøve ble pipettert til 96-brønners PCR-plate i nevnte rekkefølge. Platen og prøvene måtte hele tiden holdes på is for å hindre degradering av mRNA. Etter pipettering ble platen forseglet, mikset og sentrifugert. Til slutt ble cDNA-syntesen kjørt på vanlig PCR-maskin med følgende innstillinger:

Revers transkripsjon: 60 min ved 50 °C.

Inaktivering av enzym: 15 min ved 72 °C

Etter syntetisering av cDNA ble prøvene frosset ned ved -80 °C for seinere analyse.

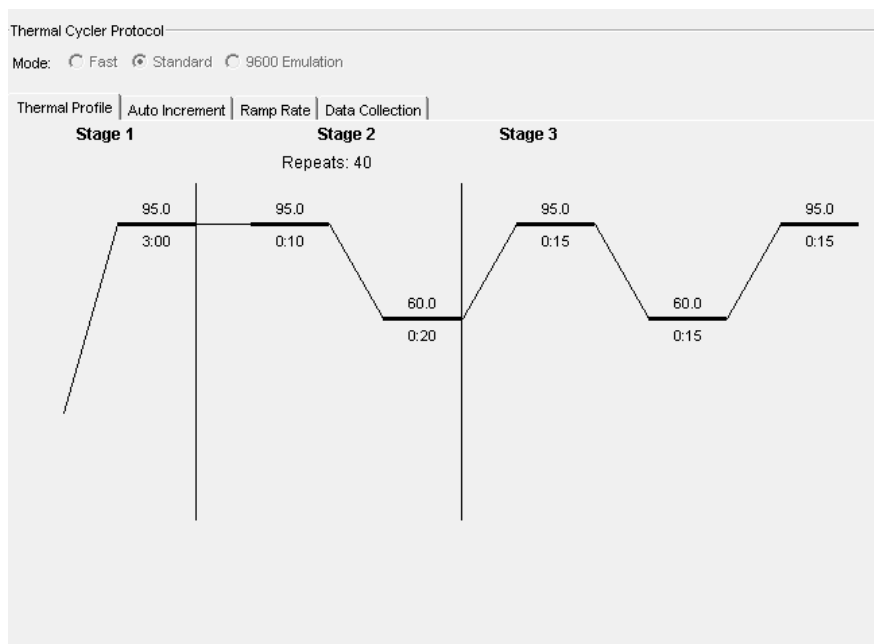
2.9.5 Real-time kvantitativ PCR-analyse med SybrGreen-detektor

Før analysen ble prøvene tint på is og fortynnet fem ganger med PCR-vann til en sluttkonsentrasjon på 5 ng/µl. Alle reaksjonskomponentene ble deretter pipettert over i ABI Prism[®] 96-Well Optical Reaction Plate. Følgende volum av hver reagens ble overført til hver brønn:

Reagens:	Volum:
SYBR [®] Green Mix	5,0 µl
PCR H ₂ O	2,3 µl
5' primer 10 µM	0,1 µl
3' primer 10 µM	0,1 µl

Tabell 2.6: Pipetteringsvolum qPCR-analyse.

Til slutt ble 2,5 µl fortynnet cDNA overført til hver brønn (12,5 ng cDNA/reaksjon). I tillegg ble negativ kontroll uten cDNA (vandig prøve med alle reagenser) og en negativ kontroll uten RT-enzym (for å kontrollere eventuelle DNA-kontaminanter i RNA-prøvene) pipettert ut i ledige brønner. Platen ble så forseglet med ABI Prism® Optical Adhesive Sealing, behandlet på vortex-maskin og sentrifugert ved 1000 rpm. i 1 min., før den ble plassert i analyseinstrumentet ABI 7900HT. Det ble kjørt 40 PCR-sykluser med følgende oppsett (figur 7):



Figur 7: Oppsett qPCR. Tallene på grafen angir temperatur i °C. Tallene under grafen angir tiden prøvene ble behandlet ved en spesifikk temperatur.

2.10 Statistiske analyser

I denne masteroppgaven blir alle data presentert som gjennomsnitt \pm standardfeil (Standard Error of Mean, SEM). For substratoksidasjonsmetoden er det utført to separate forsøk, med tre paralleller i hvert forsøk. Hver parallell bestod av minst åtte underparalleller (n) for basaloksidasjon og åtte paralleller for de ulike behandlingene. I deoksyglukose (DOG)-opptaksforsøket ble det gjennomført tre paralleller med minst tre underparalleller (n) for basalopptak og tre underparalleller for opptak i nærvær av OA. I glykogensynteseforsøket ble det gjennomført tre paralleller med minst seks underparalleller (n) for basalforhold og i nærvær av OA. I oppgaven er det tosidig paret *t*-test og tosidig uparet *t*-test som er de mest benyttede analysetestene. Begge testene er parametriske hypotesetester. Det er antatt at dataene er normalfordelte, noe det er grunn til å anta når kontrollgruppe (*PLIN2*^{+/+}) og ”pasientgruppe” (*PLIN2*^{-/-}) er splittet. Alle testene er utført i dataprogrammet GraphPad Prism 5. Paret parametrisk *t*-test er brukt for å teste effekt av behandling innen en donor. Før og etter behandling i hver parallell ble regnet som et par. Signifikante effekter av behandling er merket med #. Uparet parametrisk *t*-test er brukt for å teste forskjeller mellom donortypene (forskjell mellom *PLIN2*^{+/+} og *PLIN2*^{-/-}). Signifikante forskjeller mellom donortypene er merket med *. Det ble også benyttet ”Mann Whitney test” for å teste forskjeller mellom *PLIN2*^{+/+} og *PLIN2*^{-/-}, men det er ikke markert for denne testen i figurene. Signifikansnivå benyttet i denne masteroppgaven var $p \leq 0,05$.

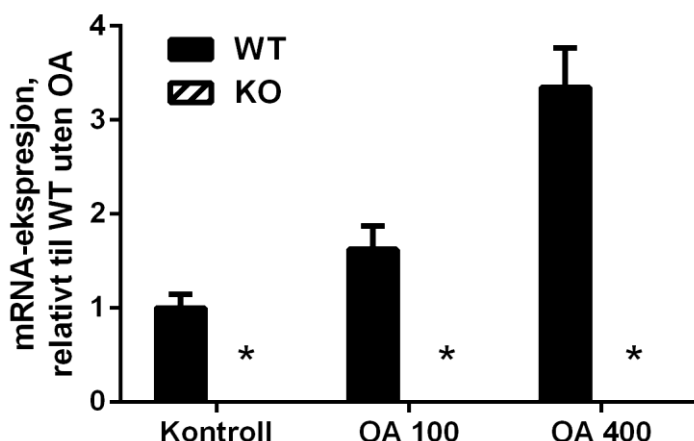
3 Resultater

I denne delen og i diskusjonsdelen (kap. 4) av oppgaven vil *PLIN2*^{+/+}-celler omtales som *PLIN2*-WT-celler, mens *PLIN2*^{-/-}-celler vil bli omtalt som *PLIN2*-KO-celler.

3.1 qPCR

3.1.1 Testing av tilstedeværelse av PLIN2 i *PLIN2*-KO-myotuber

Hensikten med dette forsøket var å vise at *PLIN2*-KO-myotubene faktisk manglet genet som koder for PLIN2 (vise at de var ekte knock out-celler). *PLIN2*-WT- og *PLIN2*-KO-celler ble sådd ut på 12-brønners cellebrett, proliferert og differensiert. På tredje differensieringsdag ble halvparten av cellene forbehandlet (24 timer) med 40 µM fettsyrefritt BSA (kontroll), 100 µM oljesyre (OA) eller 400 µM OA.

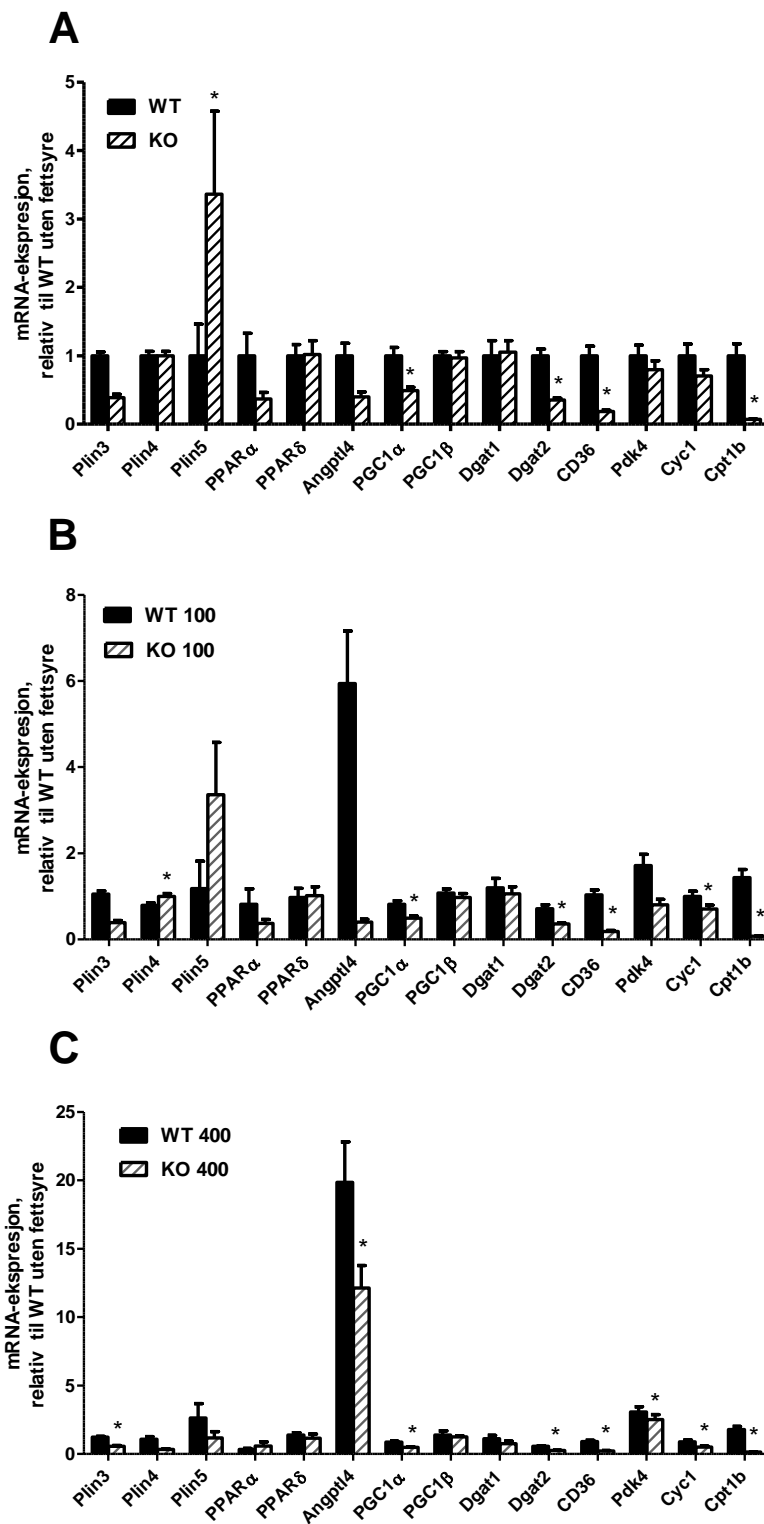


Figur 8: Innhold av mRNA fra PLIN2 i *PLIN2*-WT- og *PLIN2*-KO-myotuber. Figuren viser innhold av mRNA fra PLIN2 i hhv. *PLIN2*-WT- og *PLIN2*-KO-myotuber under basalforhold (40 µM BSA, kontroll) og etter forbehandling med 100 µM eller 400 µM oljesyre (OA). Dataene presenteres som gjennomsnittsverdi ± SEM for 3 paralleller per donor per behandling, hvor basalverdien for *PLIN2*-WT er satt til 1, n=3. *p<0,05 vs. WT.

qPCR-resultatene viser at mRNA fra PLIN2 ikke er tilstede i *PLIN2*-KO-cellene, og disse er dermed ekte knock out-celler. Innholdet av mRNA fra PLIN2 i disse cellene er signifikant lavere enn i *PLIN2*-WT-cellene (figur 8). Data viser også at mengden mRNA fra PLIN2 i *PLIN2*-WT-cellene øker med økende konsentrasjon av oljesyre (OA). Dette kan tyde på at økt tilgang på FFA induserer uttrykk av PLIN2.

3.1.2 Genekspresjonsstudier. Identifisering av andre gener viktige for energimetabolismen ved qPCR

Uttrykk av diverse gener som er viktige for energimetabolismen i skjelettmuskelceller ble undersøkt i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Hensikten med dette forsøket var å undersøke om fravær av PLIN2 påvirket uttrykket av andre gener som er viktige for energimetabolismen. Genene som ble undersøkt var PLIN3, PLIN4, PLIN5, PPAR α , PPAR δ , Angptl4, PGC1 α , PGC1 β , Dgat1, Dgat2, CD36, Pdk4, Cyc1 og CPT1b. Ekspresjonen av genene ble undersøkt etter 24-timers forbehandling med 40 μ M BSA (basalforhold) og etter 24-timers forbehandling med to ulike konsentrasjoner oljesyre (OA) (100 μ M og 400 μ M).



Figur 9: Uttrykk av gener viktige for energimetabolismen i nærvær/fravær av PLIN2. Uttrykket av mRNA i *PLIN2-KO*-myotubene er relatert til mRNA-uttrykket i *PLIN2-WT*-myotubene uten oljesyre (OA). **(A):** Genekspresjon under basalforhold (kontroll). **(B):** Genekspresjon etter forbehandling med 100 μ M OA. **(C):** Genekspresjon etter forbehandling med 400 μ M OA. Dataene resenteres som gjennomsnittsverdi \pm SEM av 3 paralleller per donor per behandling hvor basalverdien av *PLIN2-WT* er satt til 1, $n=3$. * $p<0,05$ vs. WT.

Figur 9A viser signifikant forskjell i mRNA-uttrykk for *PGC1 α* , *Dgat2*, *CD36* og *CPT1b* i *PLIN2-KO*-celler sammenlignet med *PLIN2-WT*-celler, uavhengig av om OA er tilsatt eller ikke. I tillegg er det, uten tilsatt OA, signifikant forskjell mellom *PLIN2-KO*-myotuber og *PLIN2-WT*-myotuber på uttrykket av *PLIN5* (figur 9A). Ved tilsatt 100 μ M OA i 24 timer er også ekspresjonen av *PLIN4* og *Cyc1* signifikant forskjellige, og ved tilsatt 400 μ M OA i 24 timer er også ekspresjonen av *PLIN3*, *Cyc1* og *PDK4* forskjellig. For alle disse genene, unntatt for *PLIN4* og *PLIN5*, er uttrykket lavere i *PLIN2-KO*-cellene sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotubene. For *PLIN4* og *PLIN5* ses et økt uttrykk i *PLIN2-KO*-cellene. For de resterende genene er det ikke signifikant forskjell i mRNA-uttrykk mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO*.

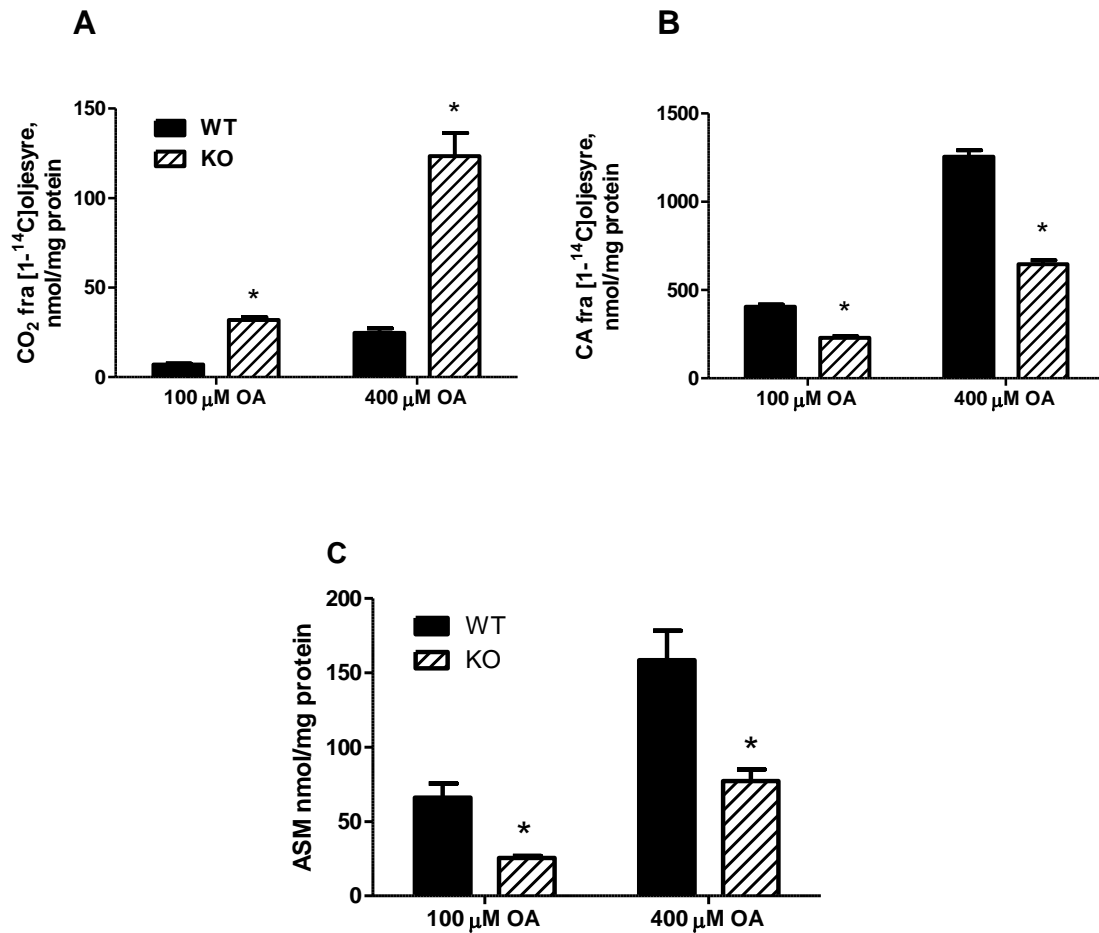
3.2 Lipidforsøkene

3.2.1 Substratoksidasjonsforsøkene

I denne oppgaven ble substratoksidasjonsmetoden brukt for å studere opptak og oksidasjon av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (OA) i myotuber fra *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-mus under basalforhold og i nærvær av HSL-hemmer (CAY-10499), ATGL-hemmer (paraoxone (E600)), disse to hemmerene i kombinasjon eller acyl-CoA syntetasehemmer (triacsin C). Prinsippene for substratoksidasjonsmetoden er beskrevet i avsnitt 2.4. Substratoksidasjonsforsøk ble utført to ganger på KO5- og WT1-donorene, samt én gang på WT2-donoren. Resultatene fra disse forsøkene ble slått sammen og presenteres her samlet.

Oksidasjon og akkumulering av oljesyre

Tidligere forsøk utført ved avdelingen viste at *PLIN2-KO*-myotuber har høyere grad av OA-oksidasjon og lavere akkumulering av OA sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber [32]. Oksidasjon til CO_2 , akkumulering av OA og ASM (β -oksidasjon til syreløselige produkter av OA) ble målt etter 24-timers formerking med to ulike konsentrasjoner av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (100 og 400 μ M).



Figur 10: Effekt av KO vs. WT ved to ulike OA-konsentrasjoner. Figuren viser (A): oksidasjon til CO₂, (B): akkumulering og (C): β-oksidasjon (ASM) av [1-¹⁴C]oljesyre i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter 24-timers forbehandling med hhv. 100 μM og 400 μM [1-¹⁴C]oljesyre. Data presenteres som gjennomsnittet ± SEM av absolute basalverdier, n=16. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, *p<0,001 for WT vs KO.

Oksidasjonsdataene (figur 10A) viser mengden ¹⁴CO₂ som cellene har frigjort i løpet av 4-timers trapping med ikke-radioaktivt forsøksmedium etter formerking med [1-¹⁴C]oljesyre. Resultatene viser signifikant økt oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Dette gjelder for begge OA-konsentrasjonene. Forskjellen i oksidasjon mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* blir tydeligere ved høyere konsentrasjon av OA.

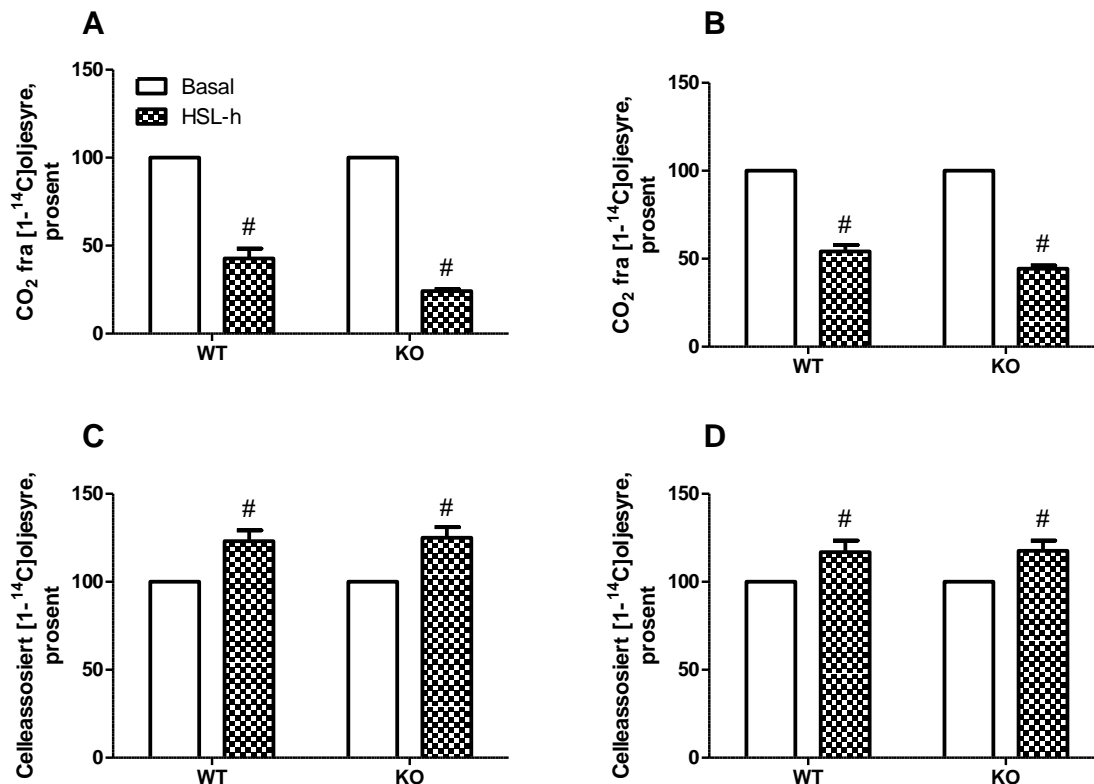
Celleassosiert (CA) data (figur 10B) viser kun innholdet av [1-¹⁴C]oljesyre i myotubene etter 4-timers trapping med ikke-radioaktivt forsøksmedium. Resultatene viser en signifikant lavere

mengde OA akkumulert i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber ved begge oljesyrekonsentrasjoner. Også her kommer forskjellen mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* tydeligere fram ved høyere OA-konsentrasjon.

Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) er et mål på β -oksidasjon av OA i cellene, og analysen ble utført for å skaffe et mer komplett bilde av oksidasjon av OA. β -oksidasjonen er signifikant lavere for *PLIN2-KO* sammenlignet med *PLIN2-WT* ved begge oljesyrekonsentrasjoner (figur 10C), selv om β -oksidasjonen øker for begge donorer ved økt tilgang på OA.

Effekt av HSL-hemmer (CAY-10499) på oksidasjon av oljesyre

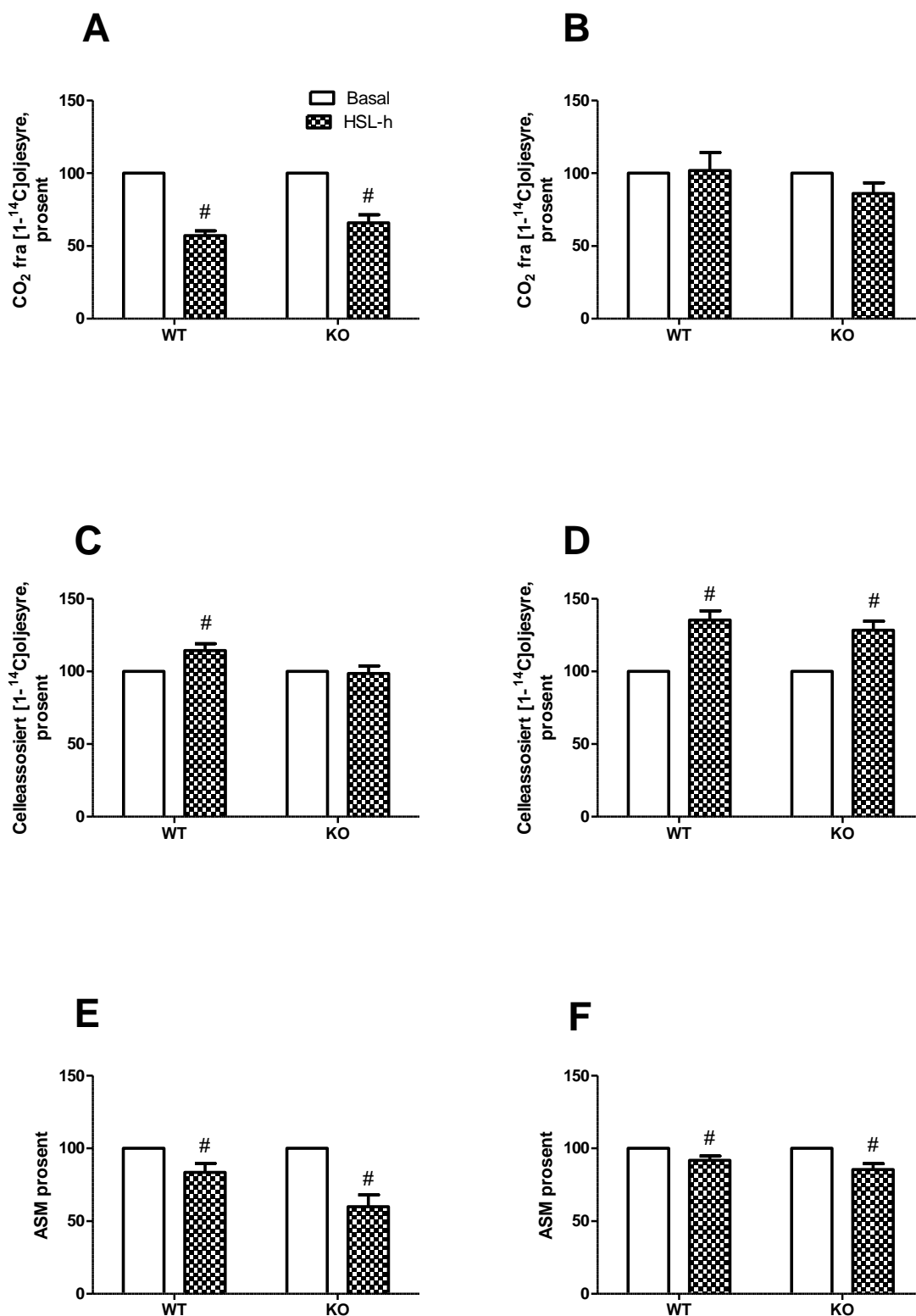
CAY-10499 er en potent hemmer av enzymet hormonsensitiv lipase (HSL). I cellene er HSL med på å mobilisere fettsyrer til produksjon av energi ved å katalysere hydrolyse av tri-, di- og monoacylglycerol samt kolesterolstre. I denne oppgaven ble CAY-10499 brukt for å undersøke hvordan hemming av HSL påvirket oksidasjon, akkumulering og ASM av oljesyre i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Oksidasjon og akkumulering ble undersøkt etter 24-timers formerking med to ulike konsentrasjoner [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (100 og 400 μM) og 4-timers akuttbehandling (trapping) i nærvær av 10 μM CAY-10499, samt etter 24-timers inkubering med to ulike konsentrasjoner av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (100 og 400 μM) og 10 μM CAY-10499. ASM ble undersøkt etter 24-timers inkubering med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre og CAY-10499.



Figur 11: Effekt av akuttbehandling med CAY-10499 på lipidmetabolismen. Figuren viser effekt av CAY-10499 på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. (B): Oksidasjon etter formerking med 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. (C): Akkumulering etter formerking med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA- (D): Akkumulering etter formerking med 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av verdier etter akuttbehandling med CAY-10499 relatert til basalverdiene, $n=32$. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig paret t-test, # $p<0,05$ mot basal.

Oksidasjonsdataene (CO_2) for 4-timers akuttbehandling viser at oksidasjonen av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre blir signifikant redusert både i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO*-myotuber når HSL hemmes. Dette gjelder for forbehandling ved begge oljesyrekonsentrasjoner (figur 11A og B). Responsen er relativt sett lik for de to donortypene (i %).

Celleassosierte (CA) data viser signifikant økt akkumulering av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i både for *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* når HSL hemmes. Også her gjelder dette for begge oljesyrekonsentrasjoner (figur 11C og D). Økningen i akkumulasjon er omtrent lik i både *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO*-myotuber.



Figur 12: Effekt av 24-timers kronisk behandling med CAY-10499 på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μ M [1-¹⁴C]OA. (B): Oksidasjon etter formerking med 400 μ M [1-¹⁴C]OA. (C): Akkumulering etter formerking med 100 μ M [1-¹⁴C]OA. (D): Akkumulering etter formerking med 400 μ M [1-¹⁴C]OA. (E): β -oksidasjon (ASM) etter formerking med 100 μ M [1-¹⁴C]OA. (F): β -oksidasjon (ASM) etter formerking med 400 μ M [1-¹⁴C]OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av verdier etter 24-timers behandling med CAY-

10499 relatert til basalverdiene, n=24. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig paret t-test, #p<0,05 mot basal.

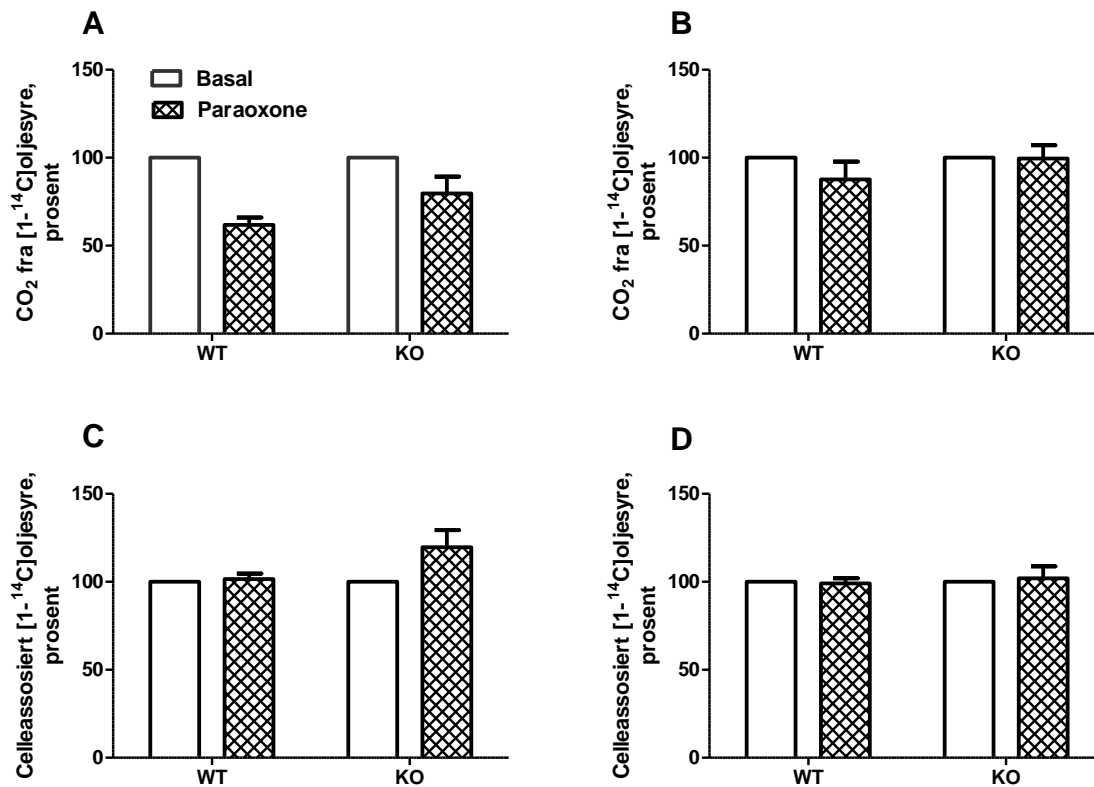
Dataene for 24-timers behandling viser at CAY-10499 har signifikant effekt på oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter forbehandling med 100 µM OA, men ikke etter forbehandling med 400 µM OA (figur 12A og B). Effekten på oksidasjon er høyest i *PLIN2-WT*-myotuber ved 100 µM OA. For 400 µM OA viser dataene ingen effekt av HSL-hemmeren.

Resultater for celleassosiert radioaktivitet (CA) viser at CAY-10499 har signifikant effekt på akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre i *PLIN2-WT*-myotuber etter forbehandling med 100 µM OA og 400 µM OA, og i *PLIN2-KO*-myotuber etter forbehandling med 400 µM OA (figur 12C og D). I *PLIN2-KO*-myotuber ved 100 µM OA endres ikke akkumuleringen (figur 12C)

ASM ble også målt etter 24-timers behandling med CAY-10499 og to ulike konsentrasjoner OA. Disse dataene viser at β-oksidasjon reduseres signifikant i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber ved begge oljesyrekonsentrasjoner (figur 12E og F). Størst effekt ses i *PLIN2-KO*-myotuber hvor verdiene mellom behandlede celler og basal er størst.

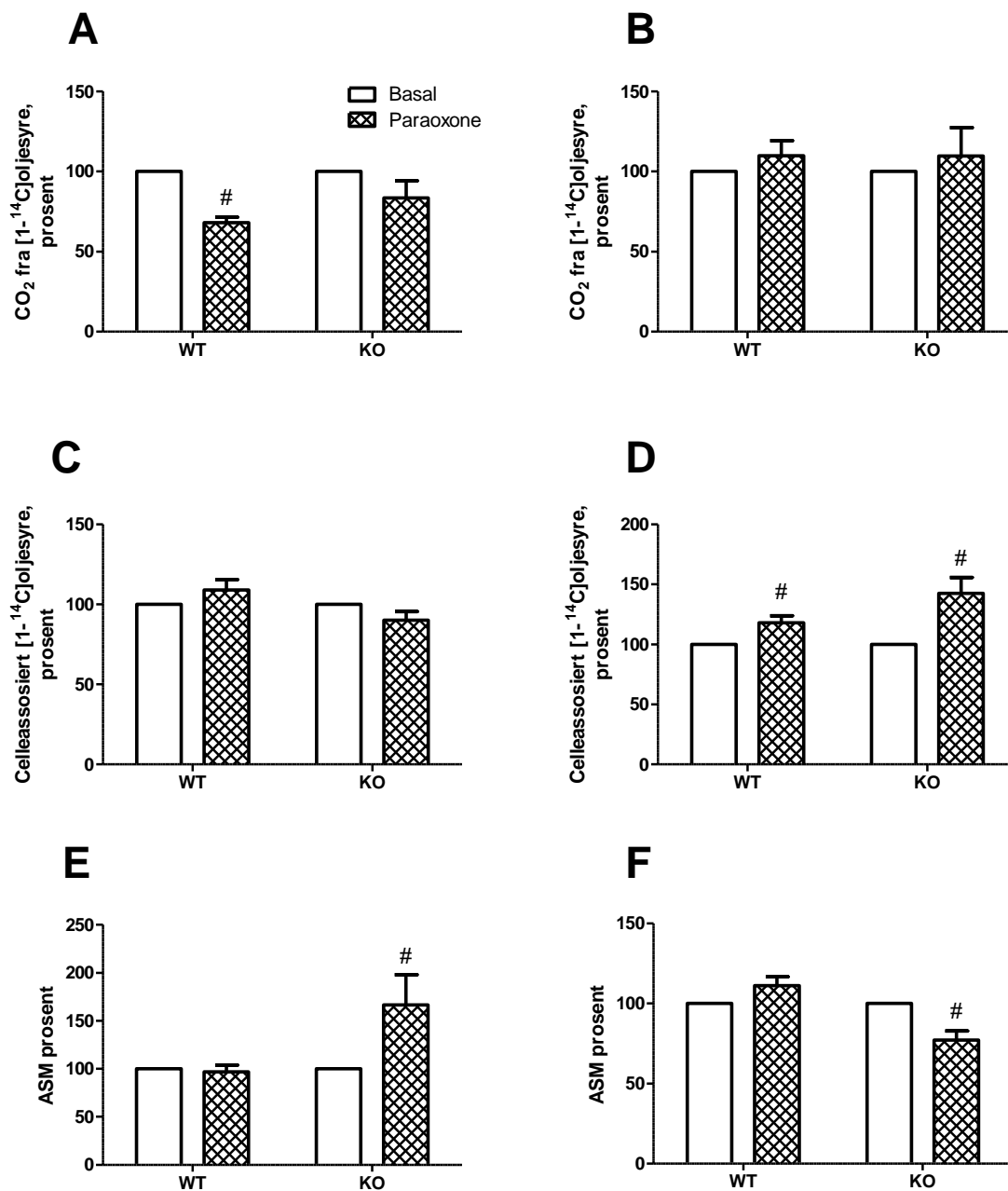
Effekt av paraoxone (E600) på oksidasjon av oljesyre

Paraoxone (E600) er en hemmer av acetylkolinesterase. Dette nevrotoksinet har også antilipolytisk effekt sannsynligvis gjennom hemming av fettvevstriglyseridlipase (ATGL). Hensikten med dette forsøket var å undersøke hvordan hemming av ATGL påvirket oksidasjon, akkumulering og β-oksidasjon (ASM) av oljesyre i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Oksidasjon og akkumulering ble målt etter 24-timers formerking med to ulike konsentrasjoner av [1-¹⁴C]oljesyre (100 og 400 µM) og 4-timers akuttbehandling (trapping) i nærvær av 5 µM paraoxone, samt etter 24-timers inkubering med to ulike konsentrasjoner av [1-¹⁴C]oljesyre (100 og 400 µM) og 5 µM paraoxone. ASM ble målt etter 24-timers inkubering med OA og paraoxone.



Figur 13: Effekt av akuttbehandling med paraoxone på lipidmetabolismen. Figuren viser effekt av paraoxone på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA. (B): Oksidasjon etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA. (C): Akkumulering etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA. (D): Akkumulering etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av verdier etter akuttbehandling med paraoxone relatert til basalverdiene, n=16. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig parett t-test, #p<0,05 mot basal.

Resultatene viser ingen signifikant effekt at paraoxone på hverken oksidasjon (figur 13A og B) eller akkumulering (figur 13C og D) av [1-¹⁴C]oljesyre etter 4-timers akuttbehandling med paraoxone. Dette gjelder både for *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber, samt for forbehandling med begge oljesyrekonsentrasjoner.



Figur 14: Effekt av 24-timers kronisk behandling med paraoxone på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA. **(B):** Oksidasjon etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA. **(C):** Akkumulering etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA **(D):** Akkumulering etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA **(E):** β -oksidasjon (ASM) etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA. **(F):** β -oksidasjon (ASM) etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av verdier etter 24-timers behandling med paraoxone relatert til basalverdiene, $n=24$. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig paret t-test, # $p<0,05$ mot basal.

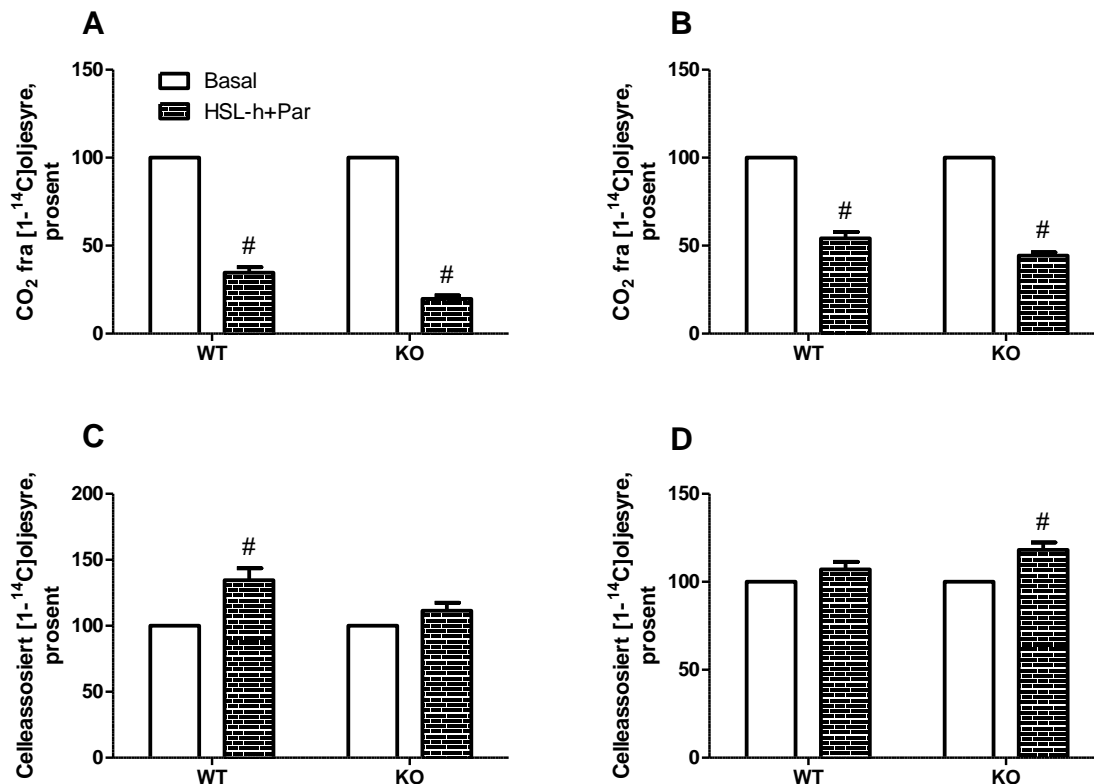
Oksidasjonsdata for 24-timers behandling med paraoxone viser kun effekt på oksidasjon i *PLIN2-WT*-myotuber etter formerking med 100 μM OA. Andre oksidasjonsdata er ikke signifikante (figur 14A og B).

Paraoxone har signifikant effekt på akkumulasjon av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber ved formerking med 400 μM OA, men ikke ved 100 μM OA (figur 14C og D). Effekten er høyest i *PLIN2-KO*-myotuber.

ASM-data viser signifikant effekt av paraoxone i *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med begge oljesyrekonsentrasjoner. Etter formerking med 100 μM OA blir β -oksidasjonen i disse myotubene økt, mens ved 400 μM OA reduseres β -oksidasjonen. Dataene viser ingen effekt på β -oksidasjon i *PLIN2-WT*-myotuber (figur 14E og F).

Effekt av HSL-hemmer og paraoxone på oksidasjon av oljesyre

Dette forsøket ble gjennomført for å studere hvordan kombinasjonsbehandling med HSL-hemmer og ATGL-hemmer påvirket oksidasjon og akkumulering av oljesyre i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Oksidasjon og akkumulering ble målt etter 24-timers formerking med to ulike konsentrasjoner [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (100 og 400 μM) og 4-timers akuttbehandling (trapping) i nærvær av 5 μM paraoxone og 10 μM CAY-10499, samt etter 24-timers inkubering med to ulike konsentrasjoner av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (100 og 400 μM) og 5 μM paraoxone og 10 μM CAY-10499. ASM ble målt etter 24-timers inkubering med OA, CAY-10499 og paraoxone.

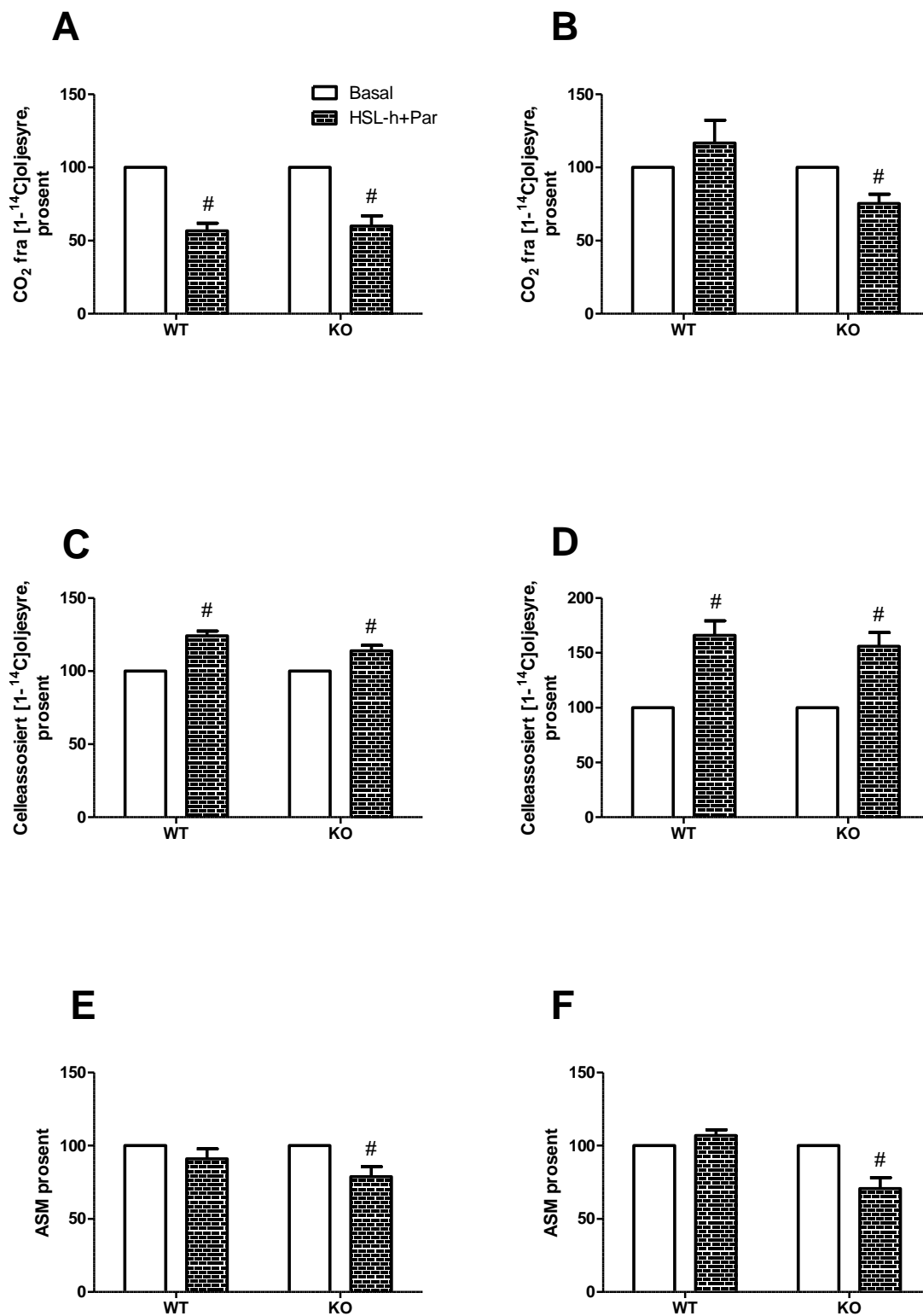


Figur 15: Effekt av akuttbehandling med paraoxone og CAY-10499 på lipidmetabolismen. Figuren viser effekt av HSL-h og paraoxone på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μM [1- ^{14}C]OA. (B): Oksidasjon etter formerking med 400 μM [1- ^{14}C]OA. (C): Akkumulering etter formerking med 100 μM [1- ^{14}C]OA. (D): Akkumulering etter formerking med 400 μM [1- ^{14}C]OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av verdier etter akuttbehandling med HSL-h og paraoxone relatert til basalverdiene, $n=32$. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig paret t-test, $\#p<0,05$ mot basal.

Oksidasjonsdata (CO_2) etter 4-timers akuttbehandling med CAY-10499 og paraoxone viser signifikant effekt av behandlingen både i *PLIN2-WT*-og *PLIN2-KO*-myotuber etter forbehandling med både 100 μM OA og 400 μM OA (figur 15A og B). Oksidasjonen av [1- ^{14}C]oljesyre reduseres mest i *PLIN2-KO*-myotuber hvor det er størst forskjell mellom basalverdier og verdier etter behandling.

Celleassosierte (CA) data viser at akkumulasjonen av [1- ^{14}C]oljesyre øker noe i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber, men det er bare økningen i *PLIN2-WT*-myotuber ved 100 μM OA (figur 15C) og i *PLIN2-KO*-myotuber ved 400 μM OA (figur 15D) som er signifikante. Økningen i akkumulasjon er størst i *PLIN2-WT* ved 100 μM OA.

Basert på data fra forsøk hvor HSL-hemmer og paraoxone ble benyttet alene, er det stor sannsynlighet for at effekten som sees hovedsakelig skyldes effekt av CAY-10499.



Figur 16: Effekt av 24-timers kronisk behandling med CAY-10499 og paraoxone på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μ M [1-¹⁴C]OA. (B): Oksidasjon etter formerking med 400 μ M [1-¹⁴C]OA. (C): Akkumulering etter formerking med 100 μ M [1-¹⁴C]OA. (D): Akkumulering etter formerking med 400 μ M [1-¹⁴C]OA. (E): β -oksidasjon (ASM) etter formerking med 100 μ M [1-¹⁴C]OA. (F): β -oksidasjon (ASM) etter formerking med 400 μ M [1-¹⁴C]OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av verdier etter 24-timers

behandling med HSL-h og paraoxone relatert til basalverdiene, n=24. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig paret t-test, #p<0,05 mot basal.

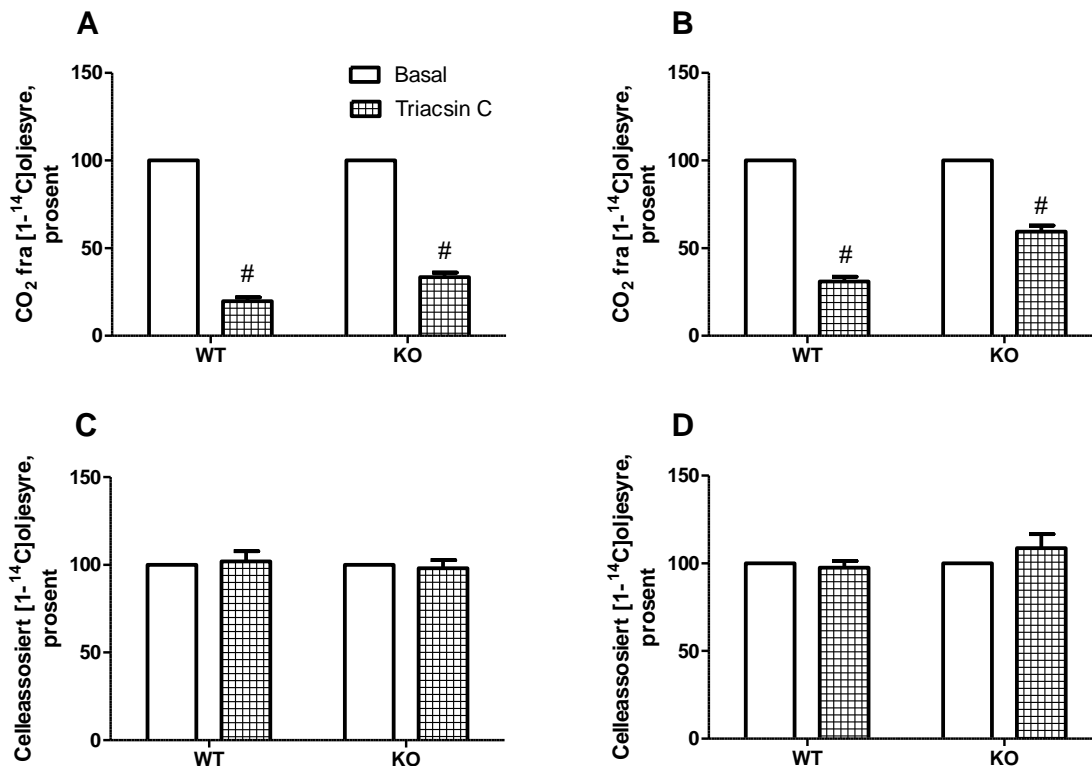
Oksidasjonsdata for 24-timers kronisk behandling med CAY-10499 og paraoxone viser signifikant redusert oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 100 µM OA (figur 16A). Etter formerking med 400 µM OA er det kun oksidasjon i *PLIN2-KO*-myotuber som reduseres signifikant (figur 16B).

Økt akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre observeres i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med begge OA-konsentrasjoner. I alle tilfeller er endringen signifikant (figur 16C og D). Økningen er størst etter formerking med 400 µM OA. Dette gjelder for begge typer myotuber.

24-timers kronisk behandling med CAY-10499 og paraoxone hadde ingen signifikant effekt på β-oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre i *PLIN2-WT*-myotuber, men i *PLIN2-KO*-myotuber var β-oksidasjonen signifikant lavere etter formerking med begge oljesyrekonsentrasjoner (figur 16E og F).

Effekt av triacsin C på oksidasjon av oljesyre

Triacsin C er en kompetitiv hemmer av enzymet acyl-CoA syntetase, som er med på å syntetisere acyl-CoA som er nødvendig for videre metabolisme av fettsyrer. Hensikten med dette forsøket var å studere hvordan hemming av acyl-CoA syntetase påvirker oksidasjon og akkumulering av oljesyre i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Oksidasjon og akkumulering ble målt etter 24-timers forbehandling med to ulike konsentrasjoner [1-¹⁴C]oljesyre (100 og 400 µM) og 4-timers akuttbehandling (trapping) med 10 µM triacsin C. Forsøk med 24-timers kronisk behandling med triacsin C ble ikke utført i denne masteroppgaven.



Figur 17: Effekt av akuttbehandling med triacsin C på lipidmetabolismen. Figuren viser effekt av triacsin C på (A): Oksidasjon etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA. (B): Oksidasjon etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA. (C): Akkumulering etter formerking med 100 μM [1-¹⁴C]OA. (D): Akkumulering etter formerking med 400 μM [1-¹⁴C]OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av verdier etter akuttbehandling med triacsin C relatert til basalverdiene, n=16. Statistiske beregninger er utført ved hjelp av tosidig paret t-test, #p<0,05 mot basal.

Triacsin C hadde signifikant effekt på oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre etter formerking med både 100 μM OA og 400 μM OA (figur 17A og B). I alle tilfeller blir oksidasjonen betydelig redusert, og effekten er størst i *PLIN2-WT*-myotuber. Her er forskjellen mellom verdiene etter behandling og basalverdiene størst.

Triacsin C hadde ingen signifikant effekt på akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre i verken *PLIN2-WT*- eller *PLIN2-KO*-myotuber (figur 17C og D). Akkumuleringen i cellene er omtrent lik før og etter behandling med triacsin C. Dette gjelder for begge oljesyrekonsentrasjoner.

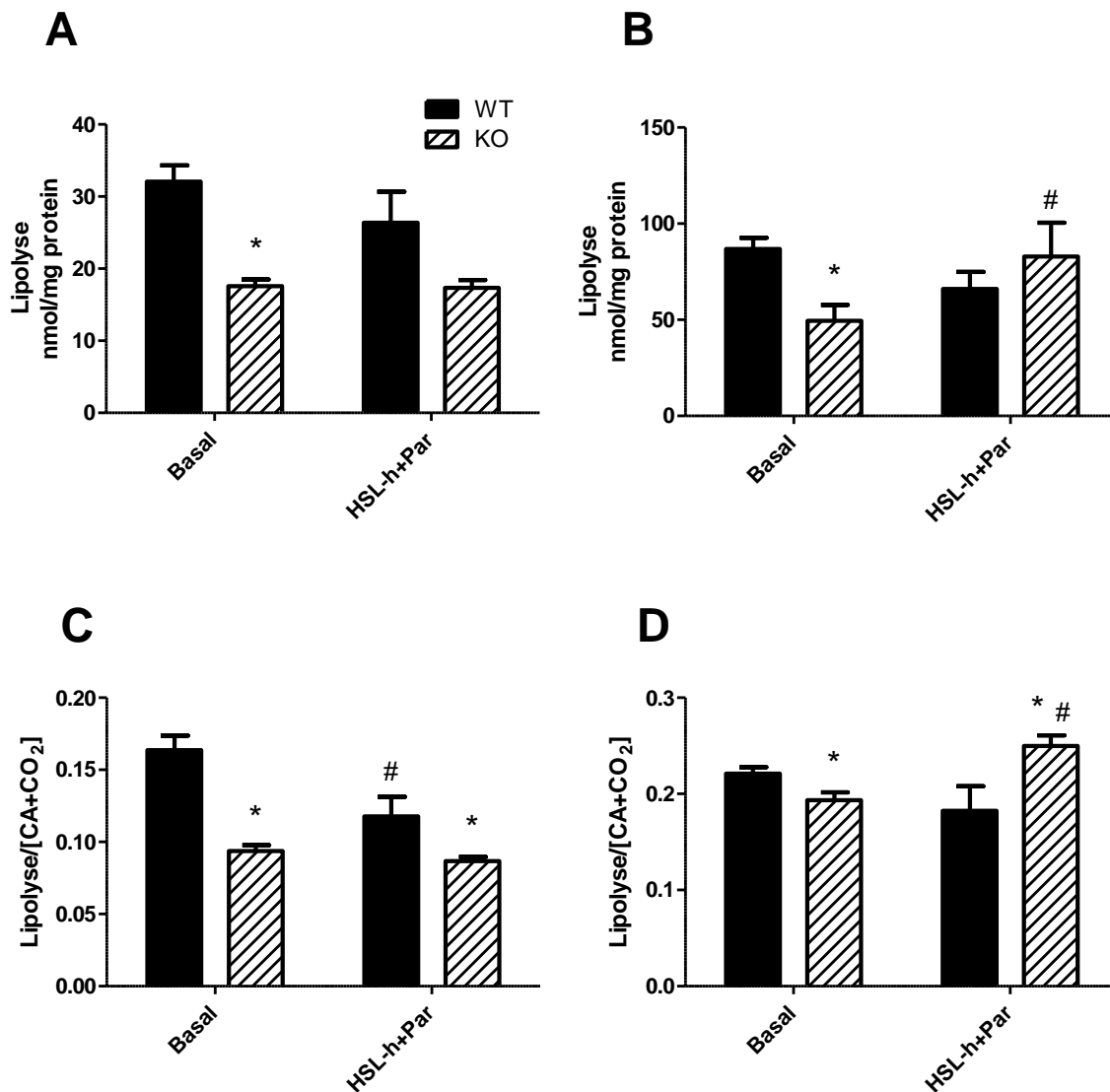
3.2.2 Lipolyse av oljesyre

Hensikten med disse forsøkene var å studere forskjellige behandlings effekt på lipolyse i *PLIN2-WT*-og *PLIN2-KO*-myotuber, samt studere forskjellen i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* uten behandlinger. Forsøkene ble utført samtidig med

substratoksidasjonsforsøkene og på de samme cellepreparasjonene. Myotubene ble formerket med enten 100 μM eller 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i 24 timer før radioaktiviteten ble fjernet og myotuber tilsatt ulike behandlinger. Etter 4-timers akuttbehandling med ulike hemmere ble 30 μl av forsøksmediet tatt ut og målt for innhold av radioaktivitet (se avsnitt 2.8.).

Effekt av HSL-hemmer og paraoxone på lipolyse

Hensikten med dette forsøket var å studere endringer i lipolyse i *PLIN2*-WT- og *PLIN2*-KO-myotuber etter 4-timers akuttbehandling med HSL-hemmeren CAY-10499 (10 μM) og ATGL-hemmeren paraoxone (5 μM) i kombinasjon.



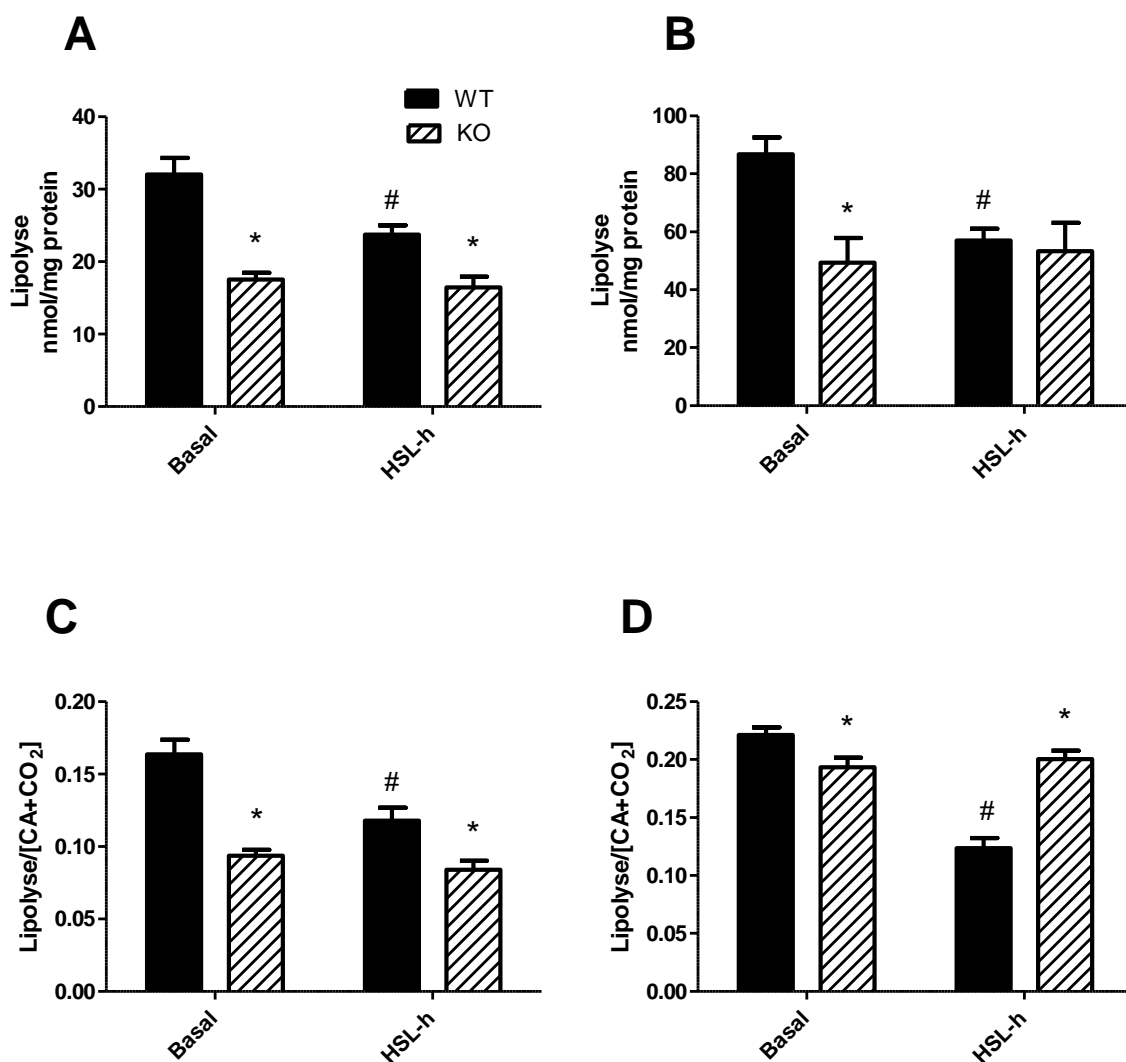
Figur 18: Effekt av akuttbehandling med CAY-10499 og praroxone på (A): Lipolyse etter formerking med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. (B): Lipolyse etter formerking med 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. (C): Relativ lipolyse etter formerking med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. (D): Relativ lipolyse etter formerking med 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA. Dataene blir

presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absolutte verdier etter 4-timers behandling med CAY-10499 og paraoxone, og 24-timers formerking med 100 μ M eller 400 μ M [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre. Effekten av behandlingen ble testet ved hjelp av tosidig paret t-test ($\#p < 0,05$ mot basal), mens forskjellen mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* ble testet ved hjelp av tosidig uparet t-test ($*p < 0,05$ mot basal).

Figur 18A (100 μ M OA) viser ingen stor effekt av behandlingen, men det er en signifikant forskjell i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* uten behandling. Lipolyse i *PLIN2-KO* er signifikant lavere enn hos *PLIN2-WT*. Denne forskjellen ses også ved 400 μ M OA (figur 18B). Her ser man også en signifikant effekt av behandlingen i *PLIN2-KO*, men ikke i *PLIN2-WT*. Det er signifikant effekt av behandlingen på relativ lipolyse (hvor stor andel av de radiomerkede lipidene som finnes i myotubene (før lipolyse) som går til lipolyse) i *PLIN2-WT* etter formerking med 100 μ M OA (figur 18C). Her ser man også signifikant forskjell i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* både med og uten behandling. Ved formerking med 400 μ M OA (figur 18D) er det signifikant effekt av behandlingen på relativ lipolyse i *PLIN2-KO*, men ikke i *PLIN2-WT*. Også her er det forskjell i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* både med og uten behandling.

Effekt av HSL-hemmer på lipolyse

Hensikten med dette forsøket var å studere effekten av CAY-10499 på lipolyse i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. CAY-10499 er en potent hemmer av enzymet hormonsensitiv lipase (HSL).



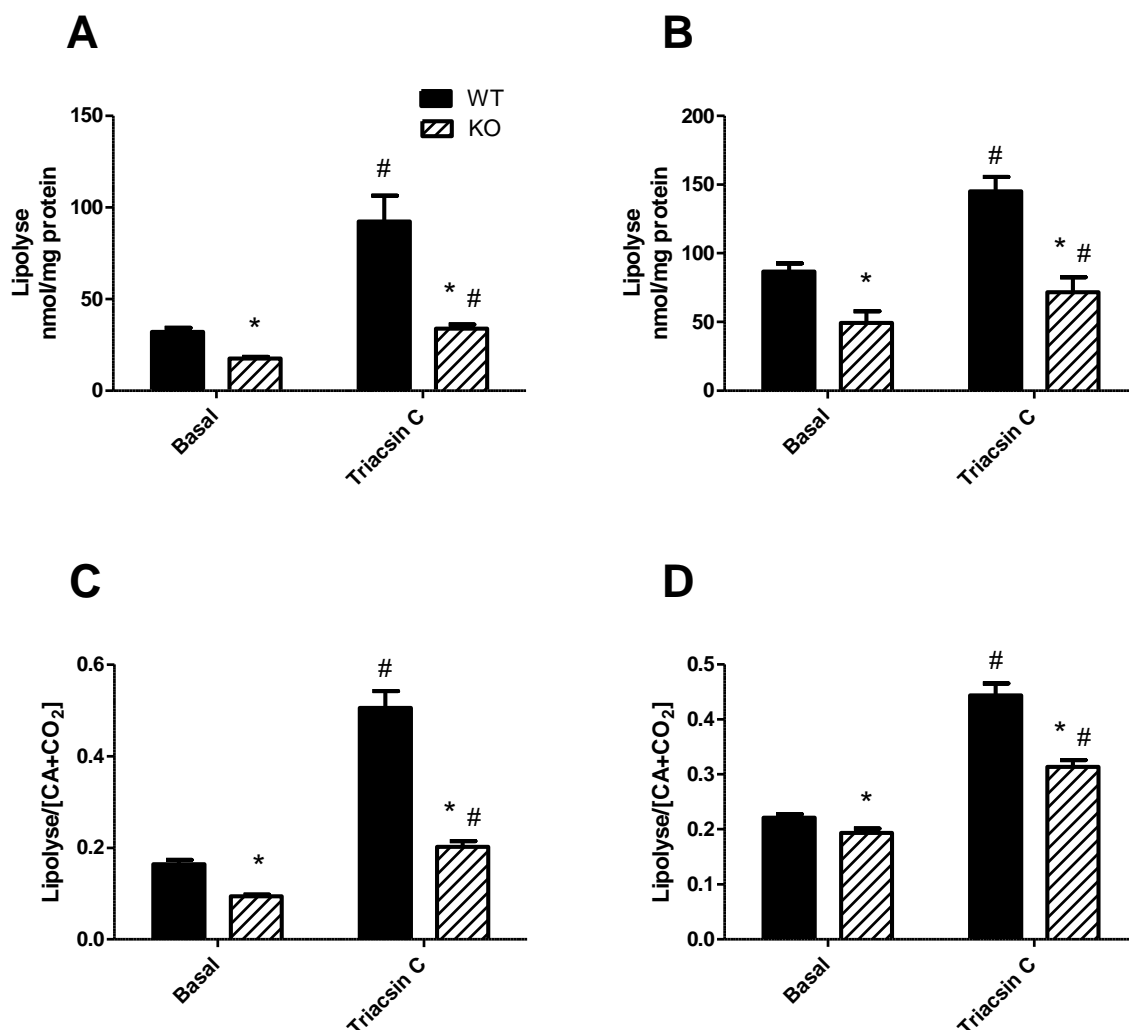
Figur 19: Effekt av akuttbehandling med CAY-10499 på (A): Lipolyse etter formerking med 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. **(B):** Lipolyse etter formerking med 400 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. **(C):** Relativ lipolyse etter formerking med 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. **(D):** Relativ lipolyse etter formerking med 400 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. Dataene blir presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absolutte verdier etter 4-timers akuttbehandling med CAY-10499 og 24-timers formerking med 100 μM eller 400 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre. Effekten av behandlingen ble testet ved hjelp av tosidig parett t-test ($\#p < 0,05$ mot basal), mens forskjellen mellom WT og KO ble testet ved hjelp av tosidig uparett t-test ($*p < 0,05$ mot basal).

Figur 19A viser signifikant effekt av CAY-10499 på lipolyse i *PLIN2-WT*-myotuber, men ikke i *PLIN2-KO*-myotuber. Det er også signifikant forskjell på lipolyse i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber både med og uten hemmer tilstede. Her var cellene formerket med 100 μM OA. Figur 19B viser effekt av CAY-10499 på lipolyse etter formerking med 400 μM OA. Her viser resultatene signifikant effekt av CAY-10499 i *PLIN2-WT*-myotuber, men ikke i *PLIN2-KO*-myotuber. Her er det signifikant forskjell i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* under basalforhold, men ikke med hemmer tilstede. Behandlingen hadde signifikant

effekt på relativ lipolyse i *PLIN2-WT*-myotuber både ved 100 μM OA og 400 μM OA, men ingen effekt på lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber (figur 19C og 19D). Ved begge oljesyrekonentrasjoner var det også signifikant forskjell på relativ lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* både med og uten CAY-10499 tilstede.

Effekt av triacsin C på lipolyse

Hensikten med dette forsøket var å studere effekten av triacsin C (en kompetitiv hemmer av enzymet acyl-CoA syntetase) på lipolyse i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber



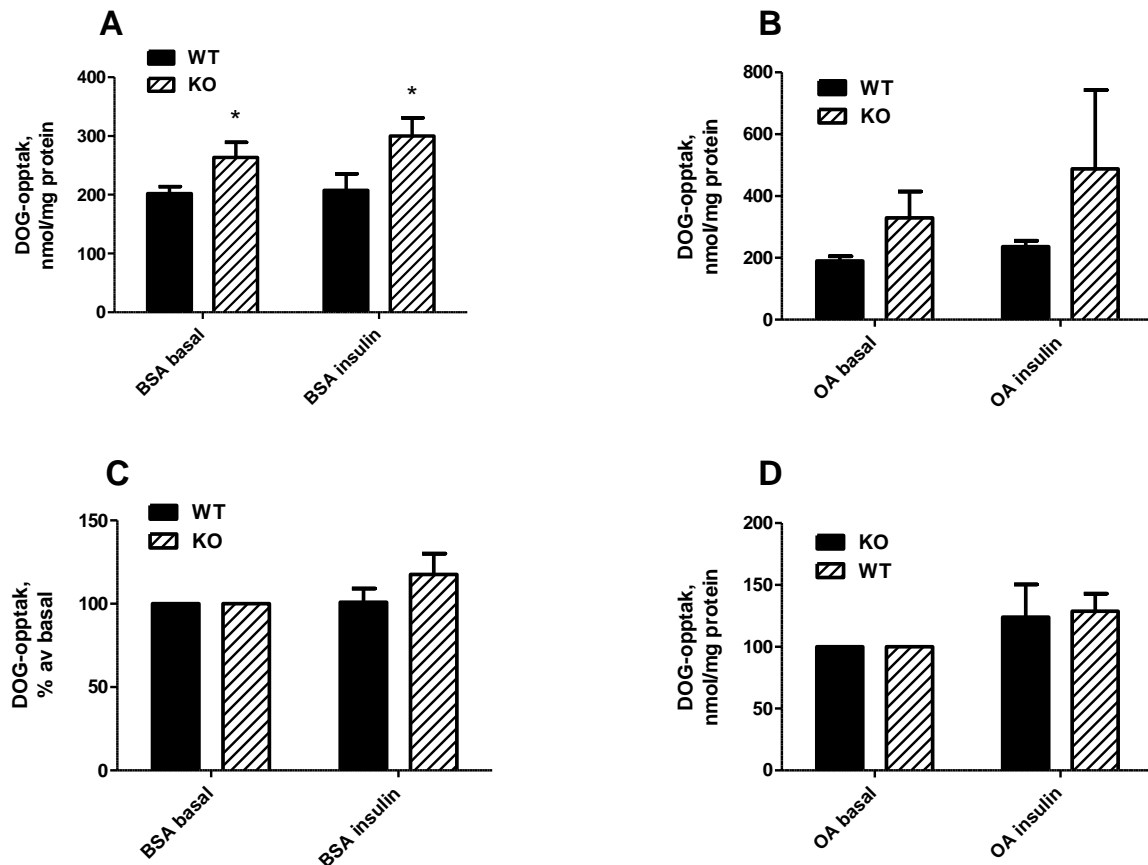
Figur 20: Effekt av akuttbehandling med triacsin C på (A): Lipolyse etter formerking med 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. (B): Lipolyse etter formerking med 400 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. (C): Relativ lipolyse etter formerking med 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. (D): Relativ lipolyse etter formerking 400 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. Dataene blir presentert som gjennomsnitt \pm SEM av absolutte verdier etter 4-timers akuttbehandling med triacsin C og 24-timers forbehandling med 100 μM eller 400 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre. Effekten av behandlingen ble testet ved hjelp av tosidig parat t-test (# p < 0,05 mot basal), mens forskjellen mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* ble testet ved hjelp av tosidig uparet t-test (* p < 0,05 mot basal).

Resultatene viser signifikant økt lipolyse i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber ved behandling med triacsin C. Dette gjelder etter forbehandling med både 100 μM OA og 400 μM OA (figur 20A og 20B). Ved begge forbehandlingene var det også signifikant forskjell i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* både med og uten triacsin C tilstede. Samme effekt hadde triacsin C på relativ lipolyse både i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber (figur 20C og D). Også her var det signifikant forskjell i lipolyse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* både med og uten behandling.

3.3 Glukoseforsøkene

3.3.1 Opptak av deoksyglukose (DOG-forsøket)

Hensikten med dette forsøket var å måle insulinstimulert opptak av 2-deoksyglukose (DOG) i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber i nærvær/fravær av oljesyre (OA). På tredje dag av differensieringsperioden ble cellene forbehandlet i 24 timer med henholdsvis 40 μM fettsyrefritt BSA (basalprøve) eller 100 μM OA (bundet til 40 μM BSA, ratio 2,5/1). Halvparten av cellene fikk tilsatt 100 nM insulin under forsøket. Mengden [^3H]DOG i cellene ble målt etter 1 times inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO_2 .

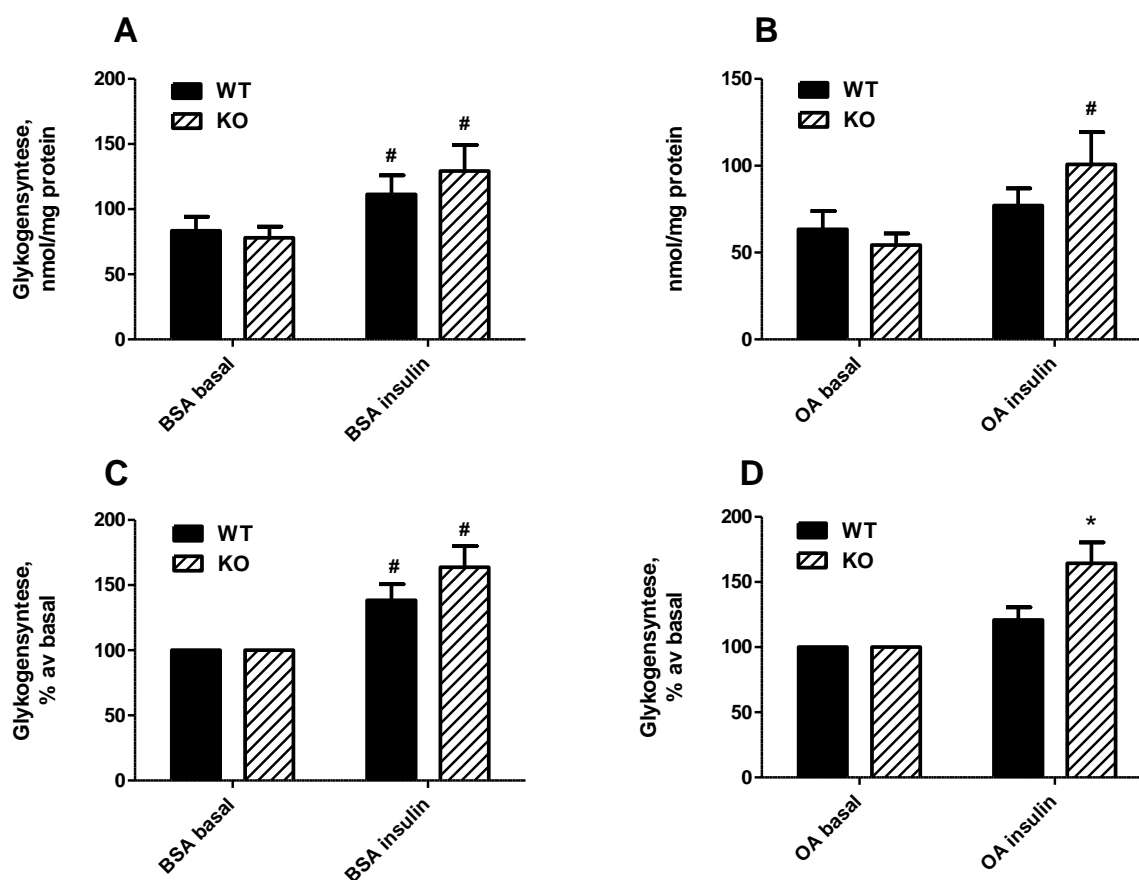


Figur 21: Opptak av DOG i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber: Figuren viser (A): Forskjell i [3 H]DOG-opptak mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* under basalforhold \pm insulin. (B): Forskjell i [3 H]DOG-opptak mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* i nærvær av 100 μ M OA \pm insulin. (C): Prosentvis effekt av insulinstimulering under basalforhold. (D): Prosentvis effekt av insulinstimulering i nærvær av 100 μ M OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av absolutte verdier, n=9. *p<0,05 vs. WT.

For basalprøvene viser resultatene et signifikant økt opptak av DOG i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber (figur 21A). Økt opptak av DOG vises både i nærvær og fravær av insulin. I nærvær av OA øker ikke opptaket av DOG i *PLIN2-KO*-myotuber signifikant sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber (figur 21B). Dataene viser heller ingen insulineffekt, dvs. at nærvær av insulin ikke påvirket opptaket av DOG i myotubene (figur 21C og D).

3.3.2 Glykogensynteseforsøket

Dette forsøket ble gjort for å studere mulige forskjeller i glykogensyntese mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. På tredje dag av differensieringstiden ble myotubene forbehandlet i 24 timer med henholdsvis 40 μM fettsyrefritt BSA eller 100 μM OA (samme behandling som i DOG-forsøket). Selve forsøket ble utført på fjerde dag av differensieringsperioden (se avsnitt 2.4). For å kunne måle mengden glykogen i myotubene var glukosen som ble myotubene inkubert med [^{14}C]glukose.



Figur 22: Glykogensyntese i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Figuren viser (A): Forskjell i glykogensyntese fra [^{14}C]glukose mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* under basalforhold \pm insulin. (B): Forskjell i glykogensyntese fra [^{14}C]glukose mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* i nærvær av 100 μM OA \pm insulin. (C): Prosentvis effekt av insulin på glykogensyntese under basalforhold. (D): Prosentvis effekt av insulin på glykogensyntese i nærvær av 100 μM OA. Dataene presenteres som gjennomsnitt \pm SEM av absolutte verdier eller % av basal, n=18. *p<0,05 vs. WT, #p<0,05 vs. basal.

Dataene viser signifikant effekt av insulin på glykogensyntese i begge donortyper under basalforhold (figur 22A), men kun i *PLIN2-KO*-myotuber ved OA tilstede (figur 22B). I alle

tilfeller øker glykogensyntesen ved tilsatt insulin. Figur 22D viser også signifikant forskjell i glykogensyntese mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO* i nærvær av OA.

4 Diskusjon

Perilipin 2 (PLIN2) er et lipiddråpeassosiert protein som finnes i omtrent alle kroppens organer og vev, inkludert skjelettmuskel [49]. Proteinet finnes på overflaten av intracellulære lipiddråper (LD) [54]. Dets funksjon i skjelettmuskelcellene er ennå ikke fullstendig klarlagt, men nyere forskning tyder på at PLIN2 har en viktig rolle i cellens energihomeostase, samtidig som det antas at proteinet er med i prosessen med lagring og akkumulering av fett i skjelettmuskelcellen og i lipogenesen [55] [56] [57]. I denne oppgaven ble en muscellemodell brukt for å studere PLIN2 sin rolle i skjelettmuskelceller, spesielt dets rolle i glukose- og lipidmetabolismen.

4.1 Validering av muscellemodellen

Muscellemodellen som ble brukt i denne oppgaven bestod av myotuber fra *PLIN2*^{+/+}- (villtype, *PLIN2*-WT) og *PLIN2*^{-/-}- (knockout, *PLIN2*-KO) mus. I forsøkene som ble gjort ble myotubene fra disse musene sammenlignet for å studere PLIN2 sin rolle i myotubene. En slik modell, hvor genet for et spesifikt protein er fjernet, er en god modell for å studere konsekvensene av proteinets fravær. Muscellemodellen måtte først valideres for at resultatene skulle være pålitelige. Dette ble gjort ved å kvantifisere mengden mRNA for PLIN2 i myotubene ved hjelp av qPCR. Myoblaster isolert fra WT1 (villtype) og KO5 (knockout) mus ble sådd ut, proliferert, differensiert til myotuber, høstet og undersøkt ved qPCR (se avsnitt 2.10.). Resultatene viste en ubetydelig mengde mRNA fra PLIN2 i KO5-myotuber sammenlignet med WT1-myotuber (figur 8). Myotuber fra KO5 hadde også blitt validert i tidligere forsøk. Det ble da funnet at PLIN2 genuttrykket var ca. 100-300 ganger lavere hos KO5-celler enn hos villtypeceller [32]. Med en slik signifikant forskjell i PLIN2 genuttrykk i KO5-celler sammenlignet med WT1-celler ble muscellemodellen godkjent for funksjonelle forsøk.

4.2 Oppsummering av oppgavens hovedfunn

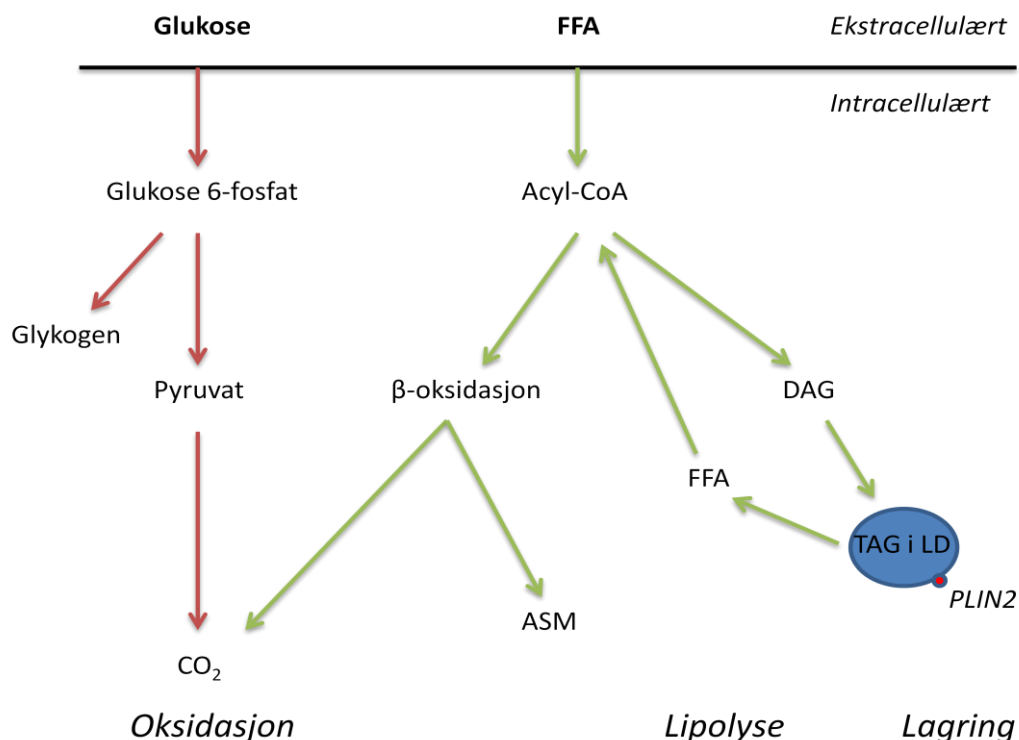
4.2.1 Oljesyreakkumulering og oksidasjon (CO₂ og ASM)

Hovedfunnene i denne masteroppgaven er observasjonene av en signifikant høyere fullstendig oksidasjon (CO₂) av [¹⁴C]oljesyre (OA) i *PLIN2*-KO-myotuber sammenlignet med *PLIN2*-

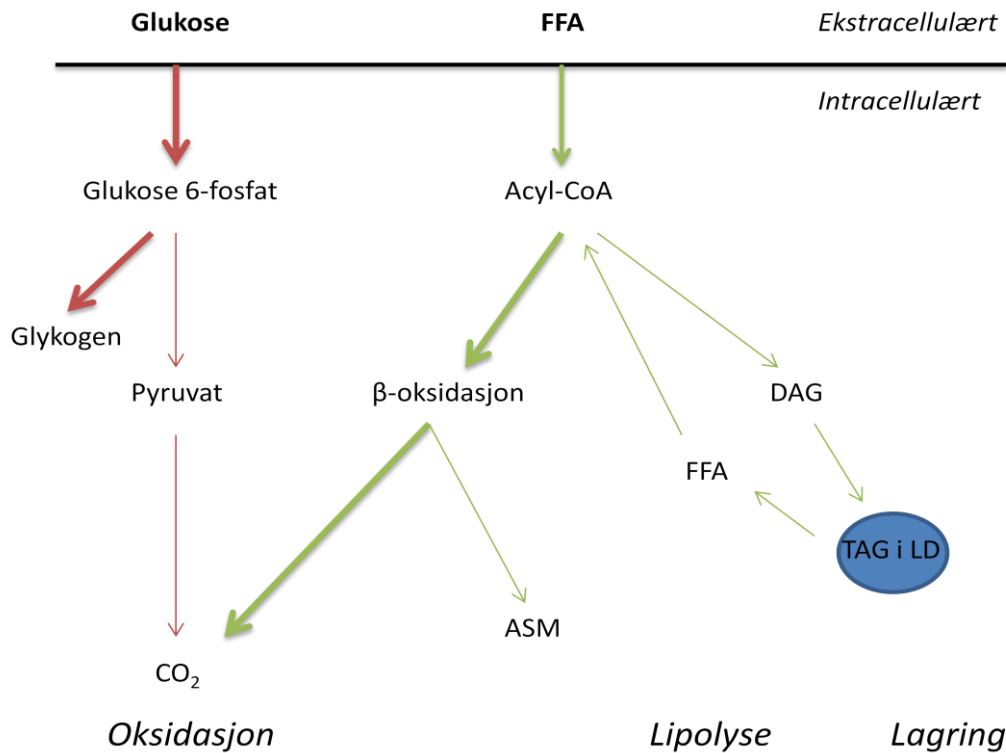
WT-myotuber. Dette gjelder etter formerking av cellulære lipider ved begge oljesyrekonsentrasjoner (100 og 400 μM). Oksidasjonen øker i både *PLIN2-WT*-myotuber og *PLIN2-KO*-myotuber med økende konsentrasjon av OA, og det samme gjør forskjellen i fullstendig oksidasjon mellom donortypene.

Det er også observert en signifikant lavere akkumulering (celleassosiert, CA) av [^{14}C]oljesyre i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN-WT*-myotuber. Dette gjelder etter formerking ved begge oljesyrekonsentrasjoner. Akkumuleringen øker i begge donortyper med økende konsentrasjon av OA. Forskjellen i akkumulering mellom *PLIN2-WT*-myotuber og *PLIN2-KO*-myotuber ser også ut til å øke med økende OA-konsentrasjon.

β -oksidasjon av [^{14}C]oljesyre til syreløselige metabolitter (ASM) ser ut til å være signifikant lavere i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Denne observasjonen er gjort etter formerking ved begge oljesyrekonsentrasjoner. β -oksidasjonen av OA øker i begge donortyper ved økende konsentrasjon av OA.



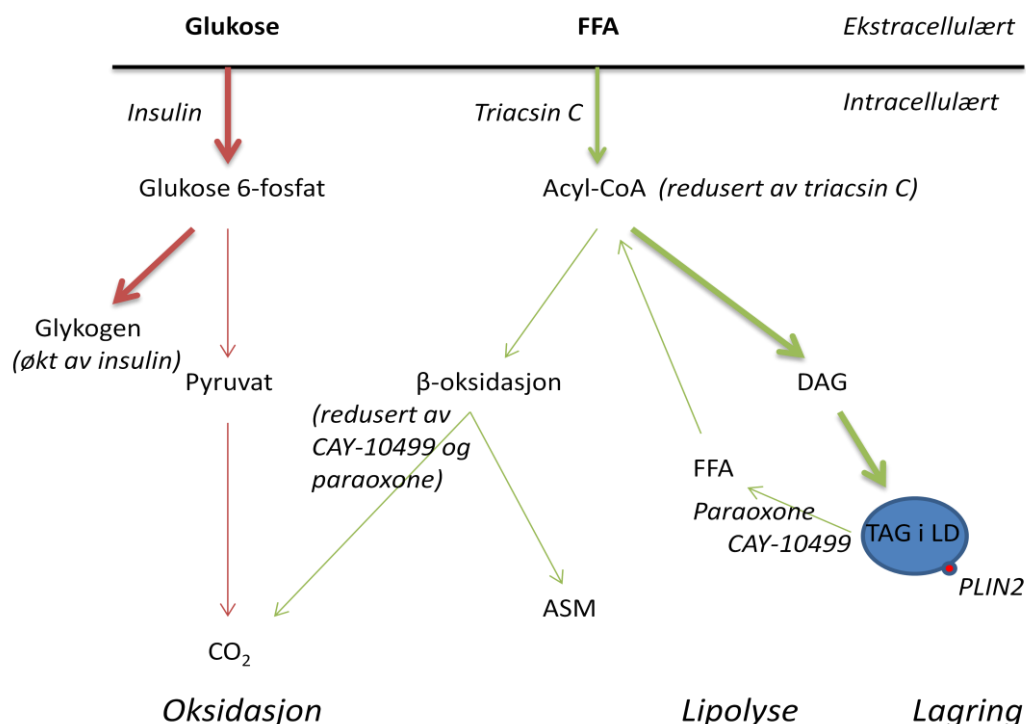
Figur 23: Energimetabolisme i *PLIN2-WT*-myotuber. Figuren viser metaboliske veier for FFA og glukose tatt opp i myotubene. FFA = frie fettsyrer, DAG = diacylglycerol, TAG = triglyserider, LD = lipiddråper, ASM = ufullstendig β -oksidasjon til syreløselige metabolitter.



Figur 24: Energimetabolisme i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Glukose som blir tatt opp i cellen vil i større grad bli lagret som glykogen. FFA som tas opp i cellen vil i større grad gå direkte til oksidasjon til CO_2 og mindre vil akkumuleres som triglyserider (TAG) i lipiddråper (LD).

4.2.2 Effekter av ulike behandlinger

Under substratoksidasjonsforsøkene og glukoseforsøkene ble ulike typer hemmere, samt insulin tilsatt i forsøksmediene for å undersøke hvordan dette påvirket akkumulering, lipolyse, β -oksidasjon (ASM) og fullstendig oksidasjon (CO_2) i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber (figur 25).



Figur 25: Effekter av ulike hemmere og insulin. Figuren viser hemmeren/insulins virkested (i energimetabolismen) og resultatet av behandlingen. Insulin økte glykogensyntesen, CAY-10499 hemmet HSL og reduserte dermed fettsyreoksidasjonen, men fremmet lagring av lipider som TAG i LD. Paraoxone hemmet ATGL og reduserte dermed lipolyse av TAG til FFA, som igjen reduserte oksidasjonen. Triacsin C hemmet scyl-CoA syntetase noe som reduserte oksidasjonen, men som ikke hadde effekt på akkumuleringen av lipider.

Begge donortyper responderte generelt godt på behandlingene med ulike hemmere. Dårligst respons ble observert etter behandling med paraoxone. Myotubene ble behandlet med hemmere enten akutt (4 timer, hemmer tilsatt i trappemediet) eller kronisk (24 timer, hemmer tilsatt i formerkingsmediet). CAY-10499 hemmet HSL godt i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Resultatet av hemmingen var signifikant nedsatt fullstendig oksidasjon av OA til CO₂ og signifikant økt akkumulering av lipider i begge donortyper. Dette ble observert etter både akutt- og kronisk behandling. ASM ble signifikant redusert i begge donortyper etter 24-timers kronisk behandling med CAY-10499. Effekt av paraoxone ble kun observert etter 24-timers kronisk behandling. Signifikant reduksjon i oksidasjon av OA ble da observert i *PLIN2-WT*-myotuber etter formerking med 100 μM [¹⁴C]OA, men ikke i *PLIN2-KO*-myotuber. Akkumuleringen av OA var signifikant økt i begge donortyper etter formerking med 400 μM [¹⁴C]OA. Behandling med paraoxone i 24 timer hadde effekt på ASM i *PLIN2-KO*-myotuber, men ikke i *PLIN2-WT*-myotuber. ASM økte etter formerking med 100 μM [¹⁴C]OA, men ble redusert etter formerking med 400 μM [¹⁴C]OA. Kombinasjonsbehandling med CAY-10499 og paraoxone viste omtrent de samme resultatene som for behandling med

CAY-10499 alene. Akuttbehandling med triacsin C resulterte i signifikant redusert fullstendig oksidasjon til CO₂ i begge donortyper, men hadde ingen effekt på akkumulering av OA i myotubene.

Det ble observert signifikant lavere grad av lipolyse og relativ lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold. Kombinasjonsbehandling med CAY-10499 og paraoxone (4-timers akuttbehandling) økte graden av lipolyse signifikant i *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 400 µM [¹⁴C]OA. 4-timers akuttbehandling med CAY-10499 alene reduserte graden av lipolyse og relativ lipolyse signifikant i *PLIN2-WT*-myotuber etter formerking med begge oljesyrekonsentrasjoner, men påvirket ikke lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber. 4-timers akuttbehandling med triacsin C økte graden av lipolyse og relativ lipolyse signifikant i begge donortyper etter formerking med begge oljesyrekonsentrasjoner.

4.2.3 Opptak av 2-deoksyglukose og glykogensyntese

Det ble observert signifikant økt opptak av 2-deoksyglukose (DOG) i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold (40 µM BSA) både i nærvær og fravær av insulin. Det ble imidlertid ikke observert økt DOG-opptak i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber etter formerking med 100 µM OA. Det ble heller ikke observert signifikant effekt av insulinstimulering på opptak av DOG i verken *PLIN2-WT*- eller *PLIN2-KO*-myotuber.

Det ble ikke observert signifikant forskjell i glykogensyntese mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber ± insulin under basalforhold. Insulinstimulert glykogensyntese etter formerking med OA var signifikant høyere i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber.

4.3 Betydning av PLIN2 for lipidmetabolismen i myotubene

Resultatene fra *in vitro* forsøkene i denne masteroppgaven viser generelt lavere akkumulering og høyere oksidasjon av [¹⁴C]OA til CO₂ i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber etter 24-timers inkubering (formerking) med OA. Resultatene viser at PLIN2 er et protein som er involvert i, og viktig, for lagring av triglyserider (TAG) i lipiddråper (LD),

noe som også er vist av Bosma et al. gjennom deres forsøk gjort på *PLIN2-KD* (knockdown) i C2C12-celler [47]. Dette belyses også gjennom lipiddistribusjonsforsøk gjort av stipendiat Yuan Zeng Feng et al. ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Etter 24-timers formerking med hhv. 100 μM og 400 μM [^{14}C]oljesyre viser disse dataene at mesteparten av OA i myotubene foreligger enten som FFA eller TAG (når man ser bort fra fosfolipidene). Mengden FFA og TAG er høyest i *PLIN2-WT*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-KO*-myotuber. Alle disse dataene er foreløpig ikke publiserte.

Dataene fra denne masteroppgaven kan tyde på at mangelfull ekspresjon av PLIN2 gjør at myotubene ikke får lagret FFA som TAG i LD like effektivt som myotuber som uttrykker dette proteinet, og at FFA som tas opp i cellen i større grad går til oksidasjon til CO_2 i mitokondriene. Flere studier antyder at PLIN2 fremmer lagring av nøytrale lipider i LD ved å hindre lipaser i å komme i kontakt med lipidene, og dermed motvirke lipolyse [57]. Mangel på PLIN2 vil dermed føre til nedsatt lagring av TAG i LD, slik som resultatene i denne oppgaven viser.

Akkumulering av [^{14}C]OA i myotubene er målt ved å måle CA (celleassosiert radioaktivitet, figur 10B). En svakhet ved denne metoden er at den ikke tar hensyn til at FFA som tas opp i myotubene også kan inngå i andre lipidklasser enn TAG lagret i LD. Dermed kan radioaktiviteten som måles også komme fra FFA i form av for eksempel fosfolipider i membraner, diacylglycerol (DAG) og kolesterolestre. Lipiddistribusjonsdata fra Feng et al. viste at OA hovedsakelig foreligger som fosfolipider etter 24-timers formerking, men at en betydelig mengde lipider også foreligger som TAG (upubliserte data). Bosma et al. viste også i forsøk at *PLIN2-KD*-myotuber i begynnelsen klarer å kompensere for den manglende evnen til å lagre FFA i LD ved å heller lagre dem i fosfolipider, DAG og ceramider [47]. Det er mulig at *PLIN2-KO*-myotuber kompenserer for manglende evne til å lagre FFA som TAG i LD på samme måte, og at den lavere mengden OA-merkede lipider som er observert i *PLIN2-KO*-myotuber skyldes metning av disse alternative lagringsmekanismene. For å måle mengden nøytrale lipider (f. eks. lipider som inngår i LD) akkumulert i myotubene, måtte man ha brukt en mer spesifikk metode som for eksempel lipidfiltrasjon. Man kunne også kvantifisert antall LD per cellekjerne i myotubene ved live cell imaging og sett om det var forskjell mellom *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT*. Knabenes viste ved hjelp av live cell imaging i sin masteroppgave at antall LD per cellekjerne var signifikant lavere hos *PLIN2-KO* enn hos

PLIN2-WT både under basalforhold og etter forbehandling med oljesyre. LD i *PLIN2-KO*-myotuber så også ut til å være mindre tettpakket enn LD i *PLIN2-WT*-myotuber [32].

I denne masteroppgaven ble myotubene formerket i 24 timer med to ulike konsentrasjoner av [¹⁴C]oljesyre. Av oksidasjons- og akkumuleringsdataene kan man se at forskjellen mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber kommer tydeligst frem etter behandling med den høyeste oljesyrekonsentrasjonen (400 µM, figur 10A). En mulig forklaring på dette er at uttrykket av PLIN2 oppreguleres i *PLIN2-WT*-myotuber når konsentrasjonen av oljesyre øker. Genekspresjonsdataene støtter dette (figur 8). Dette er også i samsvar med funnene gjort av Bosma et al. [47], hvor uttrykket av PLIN2 i C2C12-myotuber som ble inkubert med 200 µM OA økte jevnt over tid. *PLIN2-KO*-myotuber uttrykker ikke PLIN2 i utgangspunktet, og det vil derfor ikke skje en oppregulering av proteinet. Det er imidlertid også mulig at andre LD-coatende proteiner kan overta PLIN2s funksjon i myotubene når dette proteinet mangler. PLIN5 ser ut til å ha samme beskyttende funksjon mot lipolyse av fett lagret i LD som PLIN2 [46], og muligens også PLIN1. Forskjellene mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber vil antakelig heller ikke være like tydelige etter korttidsinkubering med OA, men vil altså komme tydeligere frem ved langtidsinkubering og ved økende OA-konsentrasjon fordi uttrykket av PLIN2 i *PLIN2-WT*-myotuber øker.

Dataene for ASM viser imidlertid signifikant lavere ufullstendig β-oksidasjon av OA til syreløselige produkter i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber (figur 10C). Denne observasjonen kan skyldes problemer med WT2-donoren, hvor dataene spriker sammenlignet med WT1-donoren. Når data fra WT2-donoren ekskluderes vil de resterende data vise økt ASM i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Det var forventet at ASM ville øke i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber som observert i masteroppgaven til Knabenes [32]. I denne oppgaven forklares økt ASM med opphopning av acetyl-CoA og dannelse av metabolske biprodukter som acylkarnitiner fra partiell oksidasjon av OA i *PLIN2-KO*-myotuber. Ved mangelfull lagring av nøytrale lipider i LD vil mer substrat være tilgjengelig for β-oksidasjon av OA til acetyl-CoA i mitokondriene. Dersom TCA-syklus og elektrontransportkjeden (ETC) ikke klarer å følge opp den økte β-oksidasjonen og øke forbruket av acetyl-CoA til dannelse av ATP, kan det skje en opphopning av acetyl-CoA. Dette er også beskrevet av Koves et al [74]. Observasjonen av økt oksidasjon til CO₂ i *PLIN2-KO*-myotuber kan imidlertid også samsvare med økt ETC i disse myotubene, og dette kan også være en mulig forklaring på observasjonen av lavere ASM.

Lipolyse er en metabolsk prosess hvor kroppen mobiliserer fettsyrer fra fettvev og LD som en respons på økt energibehov. Når oksidasjonen av OA til CO_2 øker vil det derfor være naturlig å anta at mobilisering av fettsyrer som kan inngå i oksidasjon også vil øke. Studier viser at PLIN2 har en rolle i reguleringen av lipolyse av TAG i LD til FFA [87]. Det er også fremsatt en hypotese om at fravær av PLIN2 fører til at mekanismen som regulerer kontakt mellom lipaser og LD i myotubene bortfaller, og at lipolysen derfor vil øke. Studier har også vist at PLIN2 fremmer akkumuleringen av lipider i LD ved å hindre lipaser i å komme i kontakt med lipidene [57]. I denne oppgaven ble det imidlertid observert en signifikant lavere lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold (figur 18, 19 og 20). Dette ble observert etter formerking ved begge oljesyrekonsentrasjoner. Disse funnene stemmer ikke overens med nevnte hypotese, ei heller med funnene gjort i [32], hvor det så ut til at lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber lå konsekvent høyere enn i *PLIN2-WT*-myotuber ved høyere konsentrasjoner av OA. Lavere grad av lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber kan ha en sammenheng med lavere akkumulering av OA. Når mindre OA akkumuleres i LD er det også mindre tilgjengelig substrat å ta av for de lipolytiske enzymene. Slikt sett kan det være at det er akkumuleringen av OA som varierer mellom donortypene, ikke lipolysen. Men siden relativ lipolyse også er lav i *PLIN2-KO*-myotuber er dette lite sannsynlig. Dessuten brukes det kun 10 μM BSA i trappemedium (vanligvis 40 μM), så lavere grad av lipolyse kan skyldes mindre BSA som trekker ut FFA i myotubene. Det er også mulig at OA som blir tatt opp i *PLIN2-KO*-myotubene går mer direkte til oksidasjon i mitokondriene for å imøtekomme det økte behovet for frie fettsyrer eller som en kompensasjon for å hindre lipidintermediater i å akkumulere, og at det derfor ikke er et like stort behov for å mobilisere FFA fra LD via lipolyse. Ved å legge sammen CA-data og oksidasjonsdata ($\text{CA} + \text{CO}_2$) vil man også få et bilde på totalopptaket av FFA i cellene. Dersom dette gjøres for data i denne oppgaven vil man se at totalopptaket av FFA er omtrent det samme for begge donortyper. Med andre ord er det ikke opptaket av FFA som endres ved mangel på PLIN2, men den intracellulære fordelingen av lipidene.

Lipolyse relatert til totalopptaket av OA ($\text{lipolyse}/[\text{CA} + \text{CO}_2]$) gir kanskje et bedre bilde av lipolysen i myotubene enn lipolyse angitt som nmol/mg protein (figur 18, 19 og 20). Relativ lipolyse er den andelen av de radiomerkede lipidene som finnes i myotubene (før lipolyse) som går til lipolyse. Det ble observert signifikant lavere grad av relativ lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold. Dette gjelder etter formerking ved begge oljesyrekonsentrasjoner.

Man kan også diskutere om metoden for måling av lipolyse som ble brukt i denne oppgaven var optimal til formålet. I denne oppgaven ble lipolyse målt som radioaktivitet talt i trappemediet etter 24-timers formerking med [^{14}C]oljesyre, vask av myotubene og 4-timers trapping (uten OA tilstede). I tidligere forsøk utført ved avdelingen er det SPA (scintillation proximity assay)-metoden som er benyttet, en metode som gjør det mulig å måle både akkumulering og lipolyse av radiomerkede substrater i samme forsøk og over lengre tid. Hadde denne metoden blitt brukt også i denne oppgaven kan det hende at resultatene hadde blitt annerledes. Avvikende resultater kan også her skyldes problemer med WT2-donoren, som jevnt over oppførte seg annerledes enn WT1-donoren.

4.4 Betydning av PLIN2 for glukosemetabolismen i myotubene

Ifølge Randle syklus kan økt fettsyreoksidasjon i celler føre til nedregulering av opptak og oksidasjon av glukose. Den foreslåtte mekanismen for dette er at økt mengde produkter fra β -oksidasjon i mitokondriene (acetyl-CoA og citrat) hemmer glukoseoksidasjon, hovedsakelig ved å hemme omdanningen av pyruvat til acetyl-CoA via hemming av PDH [61]. Ut fra dette kunne man forvente et redusert opptak av 2-deoksyglukose (DOG) i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber i nærvær av OA, slik det ble funnet i [32].

Resultatene fra denne oppgaven viser at det ikke er signifikant forskjell på opptak av DOG i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 100 μM OA (figur 21B og D).

Tilsetning av insulin til forsøksmediet for å stimulere DOG-opptak via GLUT4 hadde heller ingen signifikant effekt på opptaket i verken *PLIN2-WT* eller *PLIN2-KO*. Årsaken til denne observasjonen kan være for kort inkuberingstid med insulin (1 time) eller for lav konsentrasjon av OA (100 μM). I oppgaven som det er referert til er DOG-opptaket målt over en lengre tidsperiode og med oljesyrekonsentrasjoner opp mot 600 μM . Andre observasjoner gjort i denne oppgaven viser imidlertid at *PLIN2-KO*-myotuber har signifikant økt opptak av DOG sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold (figur 21A og C). Heller ikke her hadde tilsetning av insulin til forsøksmediet signifikant effekt på opptaket i noen av donorene. En mulig forklaring på dette kan være at myotuber *in vitro* uttrykker glukosetransportør-1 (GLUT1) i større grad enn glukosetransportør-4 (GLUT4), slik at ratioen GLUT1:GLUT4 er høyere i myotuber *in vitro* enn *in vivo*. Dermed vil mesteparten av glukoseopptaket skje via GLUT1, en glukosetransportør som ikke translokteres til

plasmamembranen som respons på insulin. GLUT1 er vanligvis kun involvert i basalopptaket av glukose. Dessuten vil myotuber i kultur mangle mikromiljøet og kommunikasjonen som oppstår mellom celler *in vivo*. *In vivo* vil opptaket av glukose reguleres av tilgang, transport og metabolisme i myotubene, mens tilgangen på glukose kan være begrenset *in vitro* [88].

Resultater fra glykogensynteseforsøket viser generelt ingen signifikante forskjeller i glykogensyntese mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber (figur 22). Kun i nærvær av 100 μ M OA og insulin (figur 22D) observeres det signifikant økt glykogensyntese i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Det kan tenkes at glukose vil kunne lagres i større grad i *PLIN2-KO*-myotuber enn i *PLIN2-WT*-myotuber i nærvær av OA. Dette fordi oksidasjonen av glukose reduseres i *PLIN2-KO*-myotuber ved økt tilgang på fettsyrer, som vist i [32]. Tilsetning av insulin til forsøksmediet hadde signifikant effekt på glykogensyntesen i begge donortyper under basalforhold (figur 22A og C), men kun effekt i *PLIN2-KO*-myotuber i nærvær av OA (figur 22B). Insulinets viktigste funksjoner i energiomsetningen er å stimulere til økt glukoseopptak, økt glykogensyntese, økt triglyseridproduksjon, økt aminosyreopptak og økt proteinsyntese, mens det reduserer glukoneogenesen [15]. Ut fra dette var det forventet at glykogensyntesen ville øke ved tilsetning av insulin.

4.5 PLIN2 og hemming av HSL

I denne oppgaven ble substansen CAY-10499 brukt for å studere hvordan hemming av enzymet hormonsensitiv lipase (HSL) påvirker lipolyse og oksidasjon. HSL katalyserer hydrolyse av tri-, di-, og monoacylglycerol, samt kolesterollestere, og er på den måten med på å mobilisere fettsyrer til produksjon av energi [78]. Både akuttbehandling (4 timer) og 24-timers kronisk behandling med CAY-10499 førte til generelt lavere oksidasjon av OA til CO₂, økt akkumulering av OA og redusert ufullstendig β -oksidasjon til syreløselige metabolitter (ASM) i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber (figur 11 og 12). Etter akuttbehandlingen er reduksjonen i oksidasjon tydeligst i *PLIN2-KO*-myotuber (figur 11A og B). Det ser ikke ut til at økt konsentrasjon av OA påvirket effekten av CAY-10499 i akuttbehandlingsforsøket, men ved 24-timers kronisk behandling reduseres ikke oksidasjonen signifikant av CAY-10499 etter formerking med 400 μ M OA (figur 12B) verken i *PLIN2-WT* eller *PLIN2-KO*-myotuber. Dette kan skyldes at ved 24-timers kronisk behandling er lipasehemmer tilstede før trappingen av CO₂ finner sted, ikke samtidig med trappingen som ved akuttbehandling.

Akkumuleringen av lipider under formerkingen vil derfor øke. Etter formerkingen vaskes myotubene slik kun lipasehemmer som har blitt tatt inn i myotubene blir igjen. CO₂ som fanges opp under trappingen vil derfor være basert på akkumuleringen av lipider som skjedde under formerkingen. En annen grunn til observasjonen kan være at OA-konsentrasjonen her er såpass høy at det er nok FFA tilgjengelig for oksidasjon selv om lipolysen delvis hemmes. CAY-10499 ser ut til å være en effektiv hemmer. Når oksidasjon til CO₂ måles med substansen tilstede, altså ved akuttbehandling, observeres mer enn 50 % reduksjon i oksidasjon.

Redusert oksidasjon, økt akkumulering og redusert ASM var i tråd med forventningen til behandlingseffekt med CAY-10499. Når HSL hemmes vil tilgjengeligheten av FFA som kan oksideres reduseres. OA som tas opp i cellene vil heller akkumuleres i myotubene og fungere som reservelager for energi.

Akuttbehandling med CAY-10499 reduserte graden av lipolyse signifikant i *PLIN2-WT*-myotuber etter formerking med begge oljesyrekonsentrasjoner. Dette gjelder også for relativ lipolyse (figur 19). Resultatene viser imidlertid ikke signifikant effekt av substansen på lipolyse i *PLIN2-KO*-myotuber (figur 19).

4.6 PLIN2 og hemming av ATGL

Paraoxone (E600, dietyl *p*-nitrofenylfosfat) er en potent hemmer av enzymet acetylcholinesterase. Dette nevrotoksinet har også en antilipolytisk effekt sannsynligvis gjennom en interaksjon med enzymet fettvevstriglyserid lipase (ATGL), men substansen regnes for å være en ganske uspesifikk lipasehemmer [79]. Akuttbehandling med paraoxone viste ingen effekt på verken oksidasjon til CO₂ eller akkumulering av OA i begge donortyper (figur 13). Det er mulig at dette skyldes for lav konsentrasjon av paraoxone (5 µM), eventuelt også for kort inkuberingstid. En del av disse resultatene kan også skyldes celledød under forsøket. 24-timers kronisk behandling med paraoxone viser noe effekt av behandlingen: Oksidasjonen reduseres signifikant i *PLIN2-WT*-myotuber etter formerking med 100 µM OA (figur 14A) og akkumuleringen av OA øker signifikant i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 400 µM OA (figur 14D). ASM-dataene fra 24-timers kronisk behandling viser at paraoxone har effekt i *PLIN2-KO*-myotuber, men disse dataene spriker: ASM er signifikant økt i *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 100 µM OA, mens det er

signifikant redusert ASM i *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 400 μ M OA (figur 14E og F). Ut fra dette kan det se ut til at behandlingstiden har noe å si, da det er brukt samme konsentrasjon paraoxone (5 μ M) i både akuttbehandling og kronisk behandling. Konsentrasjonen av paraoxone som ble tilsatt kan også ha vært for lav til at man får signifikant effekt av substansen.

Resultatene viser at hemming av ATGL har minimal effekt på oksidasjon, akkumulering og ASM i myotubene selv om enzymet er viktig for lipolyse i skjelettmuskelceller. ATGL bidrar til å mobilisere FFA for oksidasjon i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber, men effekten av å hemme ATGL er ikke like sterk som effekten av å hemme HSL. Det kan derfor virke som at HSL spiller en større rolle for lipolyse i myotuber enn ATGL. Disse påstandene er imidlertid noe usikre da det er usikkert om konsentrasjon og inkuberingstid med paraoxone var optimale under dette forsøket.

4.7 PLIN2 og hemming av HSL og ATGL i kombinasjon

Det var også ønskelig å se på hvordan hemming av både HSL og ATGL påvirket lipidmetabolismen i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Derfor ble myotubene behandlet med både CAY-10499 (10 μ M) og paraoxone (5 μ M) samtidig. Akuttbehandling (4 timer) viser signifikant redusert oksidasjon i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter forbehandling med begge OA-konsentrasjoner (figur 15A og B). Etter 24-timers kronisk behandling viste resultatene signifikant redusert oksidasjon i begge donortyper etter formerking med 100 μ M OA (figur 16A), mens det bare var signifikant redusert oksidasjon i *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking med 400 μ M OA (figur 16B). Hvis disse dataene for kombinasjonsbehandling ses på i sammenheng med dataene for behandling med CAY-10499 og paraoxone alene, er det rimelig å anta at hovedeffekten av kombinasjonsbehandlingen kan tilskrives CAY-10499, da paraoxone alene ikke hadde stor effekt på lipidmetabolismen verken i *PLIN2-WT*- eller *PLIN2-KO*-myotuber. Akkumuleringen av OA øker signifikant i begge donorer etter 24-timers kronisk behandling med CAY-10499 og paraoxone (figur 16C og D). Økningen i akkumulering er relativt sett større ved kombinasjonsbehandling enn ved behandling med begge substansene alene, så her kan det tenkes at paraoxone gir en tilleggseffekt. ASM-data viser at ufullstendig β -oksidasjon reduseres signifikant i *PLIN2-KO*-myotuber etter 24-timers kombinasjonsbehandling. Dette gjelder etter formerking ved begge OA-konsentrasjoner (figur 16E og F).

4.8 PLIN2 og hemming av acyl-CoA syntetase

Triacsin C er en kompetitiv hemmer av enzymet acyl-CoA syntetase. Syntetiseringen av acyl-CoA, som kan inngå i β -oksidasjon og CO_2 , vil dermed hemmes. I tillegg er triacsin C vist å kunne hemme inntil 93 % av *de novo* syntese av TAG, DAG, kolesterollestere og fosfolipider, samtidig som substansen kan blokkere resirkuleringen av fettsyrer som dannes fra lipolyse av TAG til nysyntese av TAG (reforesting) og oksidasjon [89]. DAG vil også kunne resirkulere til TAG, eventuelt også til fosfolipider. Ut fra dette kan man forvente redusert oksidasjon av OA etter behandling med triacsin C. Triacsin C ble bare brukt i akuttbehandling av myotubene (4 timer), og dataene fra dette viser signifikant redusert oksidasjon i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber etter formerking ved begge konsentrasjoner OA (figur 17A og B). Dette er som forventet. Reduksjonen ses tydeligst i *PLIN2-WT*-myotuber. Triacsin C hadde derimot ingen effekt på akkumulering av OA i våre forsøk. Tidligere forsøk gjort med humane myotuber har bl.a. vist at syntesen av TAG blokkeres med inntil 99,4 % ved inkubering av cellene med 10 μM triacsin C i 3 timer [90]. Når syntesen av TAG som kan inkorporeres i LD reduseres, var det også forventet at den totale akkumuleringen av lipider ville reduseres.

Behandling med triacsin C gjør det også mulig å studere forskjeller i total lipolyse mellom *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber. Etter behandling med triacsin C viser dataene at både lipolyse (nmol/mg protein, figur 20A og B) og relativ lipolyse (figur 20C og D) øker signifikant i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med basalverdiene. Økningen er størst i *PLIN2-WT*-myotuber. Disse resultatene var som forventet. Når acyl-CoA syntetase hemmes må myotubene mobilisere FFA til oksidasjon fra TAG lagret i LD. Siden akkumuleringen av OA er størst i *PLIN2-WT*-myotuber er det naturlig at økningen i lipolyse også er størst her.

4.9 Genekspresjonsstudier

Ekspresjon av gener viktig for energimetabolismen i myotubene ble undersøkt under basalforhold (figur 9A), etter forbehandling med 100 μM OA (figur 9B) og etter forbehandling med 400 μM OA (figur 9C). Generelt sett viser resultatene en nedregulering av gener for proteiner involvert i lipidmetabolismen som PGC1 α , CD36 og Cpt1b. PGC1 α er en viktig regulator for mitokondriell biogenese [32], CD36 er en membrantransportør som

medierer opptak av FFA til myotubene [34], mens CPT1b transporterer fettsyrer inn i myotubenes mitokondrier for oksidasjon [40]. For disse tre genene er uttrykket signifikant lavere i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber, uavhengig av om myotubene er forbehandlet med OA eller ikke. Det er mulig at *PLIN2-KO*-myotuber nedregulerer lipidomsetningen som en reaksjon på økt OA-oksidasjon, og at myotubene på denne måten prøver å begrense lipidmetabolismen.

For *PLIN5* er uttrykket signifikant økt i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold (figur 9A). Denne oppreguleringen kan være kompensatorisk for å erstatte manglende *PLIN2*-proteiner. *PLIN5* ser ut til å ha same beskyttende funksjon mot lipolyse av fett lagret i LD [46], og forsøk gjort på celler i kultur viste at overekspresjon av *PLIN5* gav økt akkumulering av triglyserider ved behandling med fettsyrer [53].

Etter forbehandling av myotubene med 100 μ M OA (figur 9B) ser man signifikant forskjell mellom *PLIN2-KO*- og *PLIN2-WT*-myotuber i uttrykk av *PLIN4* og *Cyc1*. *Cyc1* er et protein som inngår i myotubenes elektrontransportkjede (ETC) [32]. Uttrykket av *PLIN4* er økt i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber, mens situasjonen er motsatt for *Cyc1*. Økningen av *PLIN4* kan også være kompensatorisk da det er foreslått at ikke-lipidholdige pooler av *PLIN4* i myotubene fungerer som et reservoar for LD-coatende proteiner, og at dette tillater rask pakking av TAG i LD og maksimal lagring av energi ved tilgang på næring [52]. Nedregulering av *Cyc1* i *PLIN2-KO*-myotuber kan ses på som et forsøk på å redusere lipidmetabolismen som følge av økt tilgjengelighet av OA for oksidasjon.

Celleassosierte data (CA) viser at *PLIN2-KO*-myotuber har nedsatt evne til lagring av TAG i LD sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Dette kan ha sammenheng med redusert uttrykk av *DGAT2* i *PLIN2-KO*-myotuber (figur 9A, B og C), da *DGAT2* står for mesteparten av TAG-syntese i myotubene [32]. Når evnen til akkumulering av lipider reduseres vil uttrykket av *DGAT2* nedreguleres for å redusere syntesen av TAG.

Etter forbehandling av myotubene med 400 μ M OA (figur 9C) ser man signifikant forskjell mellom *PLIN2-KO*- og *PLIN2-WT*-myotuber i uttrykk av *PLIN3*, *Cyc1*, *Angptl4* og *PDK4*. For alle de nevnte genene er uttrykket signifikant redusert i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. *PDK4*s funksjon i myotubene er å spare på glukose ved å nedregulere glukosemetabolismen [32]. Dette gjøres ved at *PDK4* hemmer pyruvat

dehydrogenase-komplekset i mitokondriene og dermed hemmer omdannelsen av pyruvat til acetyl-CoA som kan inngå i oksidasjon. I følge Randles syklus vil økt fettsyremetabolisme nedregulere glukosemetabolismen, og på bakgrunn av dette forventet man økt uttrykk av PDK4 i *PLIN2-KO*-myotuber. Resultatene viser imidlertid det motsatte: Uttrykket av PDK4 var signifikant redusert i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Det samme ble funnet i [32], og det er derfor grunn til å trekke samme konklusjon: Det er den økte substrattilgangen fra fettsyremetabolismen som nedregulerer glukosemetabolismen gjennom mekanismer foreslått av Randle, og at økt lipidmetabolisme ved mangel på PLIN2 ikke regulerer glukosemetabolismen på gennivå via endring i nivået av PDK4 [32].

5 Konklusjon

Ut fra forsøkene gjort i denne masteroppgaven kan det konkluderes med at PLIN2 spiller en viktig rolle for energimetabolismen i skjelettmuskulatur. De eksakte mekanismene for hvordan PLIN2 påvirker energimetabolismen er fremdeles uklare.

Det ble vist på mRNA-nivå at PLIN2 uttrykkes i myotuber *in vitro* fra *PLIN2-WT*-mus, men ikke i myotuber *in vitro* fra *PLIN2-KO*-mus. Uttrykket av PLIN2 i *PLIN2-WT*-myotuber økte med økende konsentrasjon av oljesyre (OA). Fravær av PLIN2 påvirker uttrykket av andre gener viktige for energiomsetningen i myotubene, både innen lipidmetabolisme og glukosemetabolisme.

Det ble observert høyere oksidasjon av OA til CO₂ i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Samtidig ble det observert redusert OA-akkumulering i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber. Økt oksidasjon kan være et resultat av manglende evne til lagring av FFA som TAG i LD ved fravær av PLIN2. Dermed vil en større andel OA være tilgjengelig for oksidasjon i mitokondriene.

Det ble observert signifikant økt opptak av 2-deoksyglukose (DOG) til *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT*-myotuber under basalforhold, men ikke i nærvær av OA. Tilsetning av insulin hadde ingen effekt på DOG-opptaket i myotubene. Det ble observert noe høyere glykogensyntese i *PLIN2-KO*-myotuber sammenlignet med *PLIN2-KO*-myotuber etter forbehandling med 100 µM OA og i nærvær av insulin. Tilsetning av insulin økte glykogensyntesen signifikant i både *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber.

Veien videre

Det bør gjøres videre forsøk for å forsøke å kartlegge de eksakte mekanismene for PLIN2s påvirkning av energimetabolismen i skjelettmuskler. Flere forsøk bør også gjøres for å kartlegge hvordan mangel på PLIN2 påvirker lipolyse over tid. Det bør også gjøres forsøk hvor man prøver å isolere LD fra myotubene for å studere eventuelle forskjeller mellom LD i *PLIN2-WT*- og *PLIN2-KO*-myotuber.

Register

Litteraturliste

1. Verdens helseorganisasjon. *Obesity and overweight*, tilgjengelig fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (besøkt 11.9.2013).
2. Samuel, V.T., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism*. The Lancet, 2010. **375**(9733): p. 2267-2277.
3. Verdens helseorganisasjon. *BMI-classification*, tilgjengelig fra http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (besøkt 11.9.2013).
4. Verdens helseorganisasjon. *Obesity and overweight*, tilgjengelig fra <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A897> (besøkt 11.9.2013).
5. Smyth, S. and A. Heron, *Diabetes and obesity: the twin epidemics*. Nature medicine, 2006. **12**(1): p. 75-80.
6. Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhandbok. *Norsk legemiddelhandbok for helsepersonell*, tilgjengelig fra <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/82366?expand=1> (besøkt 13.9.2013).
7. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(4): p. 295-309.
8. Despres, J.-P., *Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?* Annals of medicine, 2006. **38**(1): p. 52-63.
9. International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*, tilgjengelig fra http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf (besøkt 13.9.2013).
10. Lund, J., *Vil trening in vivo prege skjelettmuskelceller in vitro?*, in *Farmasøytisk institutt*. 2013, Universitetet i Oslo.
11. Walker, R. and C. Whittlesea, *Clinical pharmacy and therapeutics*. 2011: Elsevier Health Sciences.
12. Helsedirektoratet. *Nasjonale faglige retningslinjer: Diabetes - forebygging, diagnostikk og behandling (kortversjon)*. 2009.
13. Relaix, F. and P.S. Zammit, *Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage*. Development, 2012. **139**(16): p. 2845-2856.
14. Janssen, I., et al., *Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr*. Journal of Applied Physiology, 2000. **89**(1): p. 81-88.
15. Sand, O., Ø. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. First ed. Gyldendal Norsk Forlag AS. 2001.
16. Sjaastad, O.V., K. Hove, and O. Sand, *Physiology of domestic animals*. First ed. 2003: Scan. Vet. Press.
17. Nielsen, J. and N. Ørtenblad, *Physiological aspects of the subcellular localization of glycogen in skeletal muscle*. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2012. **38**(2): p. 91-99.
18. Morgan, J.E. and T.A. Partridge, *Muscle satellite cells*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2003. **35**(8): p. 1151-1156.
19. Pannérec, A., G. Marazzi, and D. Sassoon, *Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche*. Trends in molecular medicine, 2012. **18**(10): p. 599-606.
20. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1961. **9**(2): p. 493-495.
21. Ten Broek, R.W., S. Grefte, and J.W. Von den Hoff, *Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration*. Journal of cellular physiology, 2010. **224**(1): p. 7-16.

22. Henriksen, E.J., *Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance*. Journal of Applied Physiology, 2002. **93**(2): p. 788-796.
23. Thoresen, G.H., et al., *Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2011. **85**(5): p. 227-234.
24. Tremblay, F., M.-J. Dubois, and A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2003. **8**: p. d1072-84.
25. Khan, A. and J. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-1483.
26. Houmard, J.A., et al., *Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 1): p. E437-443.
27. Zhang, B.B., G. Zhou, and C. Li, *AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome*. Cell metabolism, 2009. **9**(5): p. 407-416.
28. Sanders, M., et al., *Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade*. Biochem. J, 2007. **403**: p. 139-148.
29. Kurth-Kraczek, E.J., et al., *5'AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle*. Diabetes, 1999. **48**(8): p. 1667-1671.
30. Goodyear, P., Laurie J and M. Kahn, Barbara B, *Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity*. Annual review of medicine, 1998. **49**(1): p. 235-261.
31. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology*. Second ed. 2004: Garland Science.
32. Knabenes, I.K., *Mangel på PLIN2 i myotuber fra mus gir redusert evne til lagring av lipider og økt lipidoksidasjon: Økt lipidmetabolisme fører til redusert evne til å ta opp og oksidere glukose i skjelettmuskel*, in *Farmasøytisk institutt*. 2013, Universitetet i Oslo.
33. Rasmussen, B.B. and R.R. Wolfe, *Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle*. Annual review of nutrition, 1999. **19**(1): p. 463-484.
34. Koonen, D.P., et al., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2005. **1736**(3): p. 163-180.
35. Luiken, J.J., et al., *Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2002. **282**(2): p. E491-E495.
36. Gimeno, R., et al., *Fatty acid transport proteins*. 2003, Google Patents.
37. Jeppesen, J., et al., *Contractions but not AICAR increase FABPpm content in rat muscle sarcolemma*. Molecular and cellular biochemistry, 2009. **326**(1-2): p. 45-53.
38. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta physiologica Scandinavica, 2005. **183**(1): p. 31-41.
39. Zhang, L., et al., *Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(1): p. 1-22.
40. Kerner, J. and C. Hoppel, *Fatty acid import into mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1486**(1): p. 1-17.
41. Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam, *Mammalian mitochondrial beta-oxidation*. Biochem. J, 1996. **320**: p. 345-357.
42. Champe, P.C., R.A. Harvey, and D.R. Ferrier, *Fatty Acid and Triacylglycerol Metabolism*. Third edition ed. 2005: Lippincott Williams & Wilkins
43. Londos, C., et al., *On the control of lipolysis in adipocytes*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1999. **892**(1): p. 155-168.

44. Bosma, M., et al., *Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity*. Progress in lipid research, 2012. **51**(1): p. 36-49.
45. Thiele, C. and J. Spandl, *Cell biology of lipid droplets*. Current opinion in cell biology, 2008. **20**(4): p. 378-385.
46. Borén, J., et al., *Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship*. Journal of internal medicine, 2013. **274**(1): p. 25-40.
47. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2679-2690.
48. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. Journal of lipid research, 2007. **48**(12): p. 2547-2559.
49. Brasaemle, D., et al., *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein*. Journal of lipid research, 1997. **38**(11): p. 2249-2263.
50. Heid, H., et al., *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases*. Cell and tissue research, 1998. **294**(2): p. 309-321.
51. Wolins, N.E., B. Rubin, and D.L. Brasaemle, *TIP47 associates with lipid droplets*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(7): p. 5101-5108.
52. Dalen, K.T., et al., *Adipose Tissue Expression of the Lipid Droplet-Associating Proteins S3-12 and Perilipin Is Controlled by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1243-1252.
53. Wolins, N.E., et al., *OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3418-3428.
54. Shaw, C.S., et al., *Adipophilin distribution and colocalisation with lipid droplets in skeletal muscle*. Histochemistry and cell biology, 2009. **131**(5): p. 575-581.
55. McManaman, J.L., et al., *Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease*. Journal of lipid research, 2013. **54**(5): p. 1346-1359.
56. Meex, R.C., P. Schrauwen, and M.K. Hesselink, *Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2009. **297**(4): p. R913-R924.
57. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. **1791**(6): p. 419-440.
58. Peters, S.J., et al., *Perilipin family (PLIN) proteins in human skeletal muscle: the effect of sex, obesity, and endurance training*. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2012. **37**(4): p. 724-735.
59. Phillips, S.A., et al., *Adipocyte Differentiation-related Protein in Human Skeletal Muscle: Relationship to Insulin Sensitivity*. Obesity research, 2005. **13**(8): p. 1321-1329.
60. Shepherd, S.O., et al., *Preferential utilization of perilipin 2-associated intramuscular triglycerides during 1 h of moderate-intensity endurance-type exercise*. Experimental physiology, 2012. **97**(8): p. 970-980.
61. Randle, P., et al., *The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. The Lancet, 1963. **281**(7285): p. 785-789.
62. Sidossis, L.S. and R.R. Wolfe, *Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: the glucose-fatty acid cycle reversed*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1996. **33**(4): p. E733.

63. CARO, J.F., *CLINICAL REVIEW 26 Insulin Resistance in Obese and Nonobese Man*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1991. **73**(4): p. 691-695.
64. Weiss, R., et al., *Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning*. The Lancet, 2003. **362**(9388): p. 951-957.
65. Martins, A.R., et al., *Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 30.
66. Shulman, G.I., et al., *Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy*. New England Journal of Medicine, 1990. **322**(4): p. 223-228.
67. Chow, L., A. From, and E. Seaquist, *Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction*. Metabolism: clinical and experimental, 2010. **59**(1): p. 70.
68. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-846.
69. Schaffer, J.E., *Lipotoxicity: when tissues overeat*. Current opinion in lipidology, 2003. **14**(3): p. 281-287.
70. Watt, M.J., *Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance?* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2009. **36**(1): p. 5-11.
71. Vettor, R., et al., *Review article: adipocytokines and insulin resistance*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2005. **22**(s2): p. 3-10.
72. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-871.
73. Kelly, A., et al., *Glutaminolysis and Insulin Secretion From Bedside to Bench and Back*. Diabetes, 2002. **51**(suppl 3): p. S421-S426.
74. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance*. Cell metabolism, 2008. **7**(1): p. 45-56.
75. Nguyen, C.T.L., *Perilipin-2s rolle i fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel: Studier på muskelceller fra Plin2-knockout-mus*, in Farnasøytisk institutt. 2012, Univerisitetet i Oslo.
76. Van Loon, L.J., et al., *Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2004. **287**(3): p. E558-E565.
77. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(12): p. 5755-5761.
78. Cayman Chemical. CAY10499, tilgjengelig fra www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10007875 (besøkt 15.5.2014).
79. Dinnendahl, V., et al., *Studies on the mechanism of the antilipolytic effect of paraoxon*. Archiv für Toxikologie, 1973. **30**(2): p. 175-182.
80. Zambon, A., S.I. Hashimoto, and J. Brunzell, *Analysis of techniques to obtain plasma for measurement of levels of free fatty acids*. Journal of lipid research, 1993. **34**(6): p. 1021-1028.
81. Igal, R., P. Wang, and R. COLEMAN, *Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid:*

- evidence for functionally separate pools of acyl-CoA. *Biochem. J.*, 1997. **324**: p. 529-534.
82. Wensaas, A., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *Journal of lipid research*, 2007. **48**(4): p. 961-967.
 83. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical biochemistry*, 1976. **72**(1): p. 248-254.
 84. Biotechnology, S.C. *BCA Protein Assay Kit: sc-202389*, Tilgjengelig fra <http://www.scbt.com/datasheet-202389.html> (besøkt 19.3.2014).
 85. Denyer, S.P., N.A. Hodges, and S.P. Gorman, *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology*. Seventh ed. 2004: Blackwell Science.
 86. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. 2005.
 87. Listenberger, L.L., et al., *Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover*. *Journal of lipid research*, 2007. **48**(12): p. 2751-2761.
 88. Aas, V., et al., *Are cultured human myotubes far from home?* *Cell and tissue research*, 2013. **354**(3): p. 671-682.
 89. Corpeleijn, E., et al., *Oxidation of intramyocellular lipids is dependent on mitochondrial function and the availability of extracellular fatty acids*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2010. **299**(1): p. E14-E22.
 90. Badin, P.-M., et al., *Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58*. *Journal of lipid research*, 2012. **53**(5): p. 839-848.

6 Vedlegg

6.1 Medier til celledyrking.

6.1.1 ferasjonsmedium.

- 500 ml. Hams F10 Glutamax nutrient mixture.
- 100 ml. Føtalt bovint serum (FBS).
- 2,5 ml. Penicillin/streptomycin (100 U/ml. / 100 µg/ml).
- 2,5 ml. fungizone (250 µg/ml amfotericin).
- 250 µl (5 ng/ml.) Basic fibroblast Growth Factor (BFGF).

6.1.2 Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium.

- 250 ml Hams F-10 Glutamax nutrient mixture.
- 250 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM) (1 g/L glukose).
- 100 ml Føtalt bovint serum (FBS).
- 2,5 ml Penicillin/streptomycin (100 U/ml. / 100 µg/ml.).
- 2,5 ml fungizone (250 µg/ml amfotericin).
- 250 µl (5 ng/ml.) Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF).

6.1.3 Fusjonsmedium (differensieringsmedium).

- 250 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM) (1 g/L glukose).
- 10 ml hesteserum.

- 2,5 ml penicillin/streptomycin (100 U/ml. / 100 µg/ml.)
- 2,5 ml fungizone (250 µg/ml. amfotericin).

6.1.4 Frysemedium.

Til fire kryorør (6 ml frysemedium) brukes:

- 3,2 ml Proliferasjonsmedium eller Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium.
- 0,8 ml DMSO.
- 2 ml FBS.

6.2 0,01 % kollagen I-behandlede celleflasker.

100 % kollagen I og autoklavert H₂O brukes til å lage en 1 % kollagen I-mellomløsning, som igjen brukes til å lage 0,01 % kollagen I. Dette fordi kollagen I er høyviskøst og svært vanskelig å arbeide med i høye konsentrasjoner.

- Kollagen I-mellomfortynning fortynnes i autoklavert H₂O til 0,01 % sluttkonsentrasjon.
- 0,01 % kollagen I-løsning tilsettes NUNC-celleflasker slik at løsningen dekker hele vekstflaten (2 ml løsning til 75 cm² celleflasker).

Flaskene inkuberes innpakket i plast i kjøleskap over natt. Deretter fjernes løsningen fra flaskene, og flaskene tørkes uten lokk ved romtemperatur i avtrekksskap i 2-3 timer. Flaskene lagres deretter innpakket i plast ved romtemperatur.

6.3 Andre medier.

6.3.1 Medier til substratoksidasjonsforsøk.

Forbehandlingsmedium til 24-timers forbehandling.

Til 160 brønner (2 brett, 11 ml):

55 µl radioaktiv oljesyre

11 ml differensieringsmedium (se oppskrift over)

83 µl kald (ikke-radioaktiv) oljesyre i DMEM steril (100 µM OA)

358 µl kald (ikke-radioaktiv) oljesyre i DMEM steril (400 µM OA)

Radioaktiv oljesyre blandes med differensieringsmedium i reagensrør. Blandingen deles deretter i nye rør á 5,5 ml. I det ene røret tilsettes 83 µl kald oljesyre i DMEM steril (final: 100 µM OA), og i det andre røret tilsettes 358 µl kald oljesyre i DMEM steril (final: 400 µM OA).

Trappemedium til 4-timers trapping.

Til 160 brønner (2 brett, 11 ml):

11 µl L-karnitin, 1 mM

46 µl BSA, 10 µM

11 ml DPBS med HEPES

De ulike behandlingene (paraoxone, CAY-10499, triacsin C og FCCP) tilsettes direkte i trappemedium før overføring til cellebrett.

6.3.2 Medier til DOG-forsøk.

Pre-inkubasjonsmedium.

Til 14 ml medium: 58 µl BSA (final: 10 µM, stock: 2,4 mM)

13,9 ml DMEM Glutamax tilsatt 5,5 mM glukose

± 1,17 µl insulin (final: 100 nM, stock: 0,6 mM)

BSA blandes med DMEM Glutamax tilsatt 5,5 mM glukose. Blandingen deles i to rør á 7 ml, hvorpå det ene røret tilsettes beregnet mengde insulin.

Opptaksmedium.

Til 14 ml medium: 58 μ l BSA (final: 10 μ M, stock: 2,4 mM)

13,9 ml DMEM Glutamax tilsatt 5,5 mM glukose

14 μ l [3 H]deoksyglukose (final: 1 μ Ci/ml, stock: 1000 μ Ci/ml)

\pm 1,17 μ l insulin (final: 100 nM, stock: 0,6 mM)

BSA og [3 H]deoksyglukose blandes med DMEM Glutamax tilsatt 5,5 mM glukose.

Blandingen deles i to rør á 7 ml, hvorpå det ene røret tilsettes beregnet mengde insulin.

6.3.3 Forsøksmedium til glykogensynteseforsøk.

Til 12,5 ml medium: 125 μ l D[U- 14 C]glukose (final: 1 μ Ci/ml, stock: 100 μ Ci/ml)

50 μ l BSA (final: 10 μ M, stock: 2,4 mM)

8 μ l glukose (final: 0,65 mM, stock: 1000 mM)

125 μ l pyruvat (final: 1 mM, stock: 100 mM)

12,2 ml DMEM Glutamax

\pm 10,4 μ l insulin (final: 100 nM, stock: 0,6 mM)

D[U- 14 C]glukose, BSA, glukose og pyruvat blandes med DMEM Glutamax. Blandingen deles i to rør á 6,25 ml, hvorpå det ene røret tilsettes beregnet mengde insulin.

6.3.4 1 x høstebuffer (PBS).

8 g NaCl

0,2 g KH₂PO₄

2,9 g Na₂HPO₂2H₂O

0,2 g KCl

ad 1 liter dH₂O

pH justeres til 7,2-7,4 med 1 M H₂SO₄

6.3.5 DPBS med HEPES.

500 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS)

1,19 g HEPES

pH justeres til 7,2 med 1 M H₂SO₄

6.3.6 Primere til real-time qPCR med SYBR Green.

GENER:	PRIMERE:
PLIN 2:	F: GGGCTAGACAGGATGGAGGA R: CACATCCTTCGCCCCAGTTA
PLIN3:	F: CGAAGCTCAAGCTGCTATGG R: TCACCATCCCATACGTGGAAC
PLIN4:	F: ACCAACTCACAGATGGCAGG R: AGGCATCTTCACTGCTGGTC
PLIN5:	F: GGTGAAGACACCACCCTAGC R: CCACCACTCGATTCAACCACA
PPAR α :	F: ACTACGGAGTTCACGCATGT R: GTCGTACACCAGCTTCAGCC
PPAR δ :	F: ACATGGAATGTCGGGTGTGC R: CGAGCTTCATGCGGATTGTC
Angpt14:	F: AAGAGGCTTCCCAAGATGACC R: TTCTTGGAAGAGTTCCTGGCA
PGC1 α :	F: AGTCCCATACACAACCGCAG R: CCCTTGGGGTCATTTGGTGA
PGC1 β :	F: ACGTGGACGAGCTTTCCTG R: TTCAGAGCGTCAGAGCTTGC
Dgat1:	F: CCATACCCGGGACAAAGACG R: GAATCTTGCAGACGATGGCAC
Dgat2:	F: GGCTACGTTGGCTGGTAACT R: ATGGTGTCTCGGTTGACAGG
CD36:	F: AGGCATTCTCATGCCAGTCG R: TGTACACAGTGGTGCCTGTT
Pdk4:	F: AAGATGCTCTGCGACCAGTA R: CAATGTGGATTGGTTGGCCTG
Cyc1:	F: GGCTCCTCCCATCTACACAGAA R: GTGGCGACATCCTTAGCTACTT

Cpt1b:	F: CCCTCATGGTGAACAGCAACT R: GCATTGCCTAGACGGGCTG
---------------	--

Tabell 6.1: Oversikt over benyttede primere.

6.3.7 Oppsett DOG-forsøk.

40 μ M BSA	40 μ M BSA + 100 nM insulin	100 μ M OA	100 μ M OA + 100 nM insulin
40 μ M BSA	40 μ M BSA + 100 nM insulin	100 μ M OA	100 μ M OA + 100 nM insulin
40 μ M BSA	40 μ M BSA + 100 nM insulin	100 μ M OA	100 μ M OA + 100 nM insulin

Tabell 6.2: Skjematisk oversikt over oppsett til DOG-forsøk. Én rute i tabellen tilsvarer én brønn på cellebrettet.

6.3.8 Oppsett glykogensynteseforsøk.

40 μ M BSA	40 μ M BSA	40 μ M BSA	100 μ M OA	100 μ M OA	100 μ M OA
40 μ M BSA +100 nM ins	40 μ M BSA +100 nM ins	40 μ M BSA +100 nM ins	100 μ M OA +100 nM ins	100 μ M OA +100 nM ins	100 μ M OA +100 nM ins
40 μ M BSA	40 μ M BSA	40 μ M BSA	100 μ M OA	100 μ M OA	100 μ M OA
40 μ M BSA +100 nM ins	40 μ M BSA +100 nM ins	40 μ M BSA +100 nM ins	100 μ M OA +100 nM ins	100 μ M OA +100 nM ins	100 μ M OA +100 nM ins.

Tabell 6.3: Skjematisk oversikt over oppsett til glykogensynteseforsøk. Én rute i tabellen tilsvarer én brønn på cellebrettet.

6.3.9 Oppsett substratoksidasjonsforsøk.

Første forsøk:

		100 μ M OA, radioaktiv					400 μ M OA, radioaktiv					
Behandling:		Par	HSLH	Par + HSLH	Basal		Basal		Par + HSLH	HSLH	Par	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						FCCP	FCCP					
B						FCCP	FCCP					
C						FCCP	FCCP					
D						FCCP	FCCP					
E						FCCP	FCCP					
F						FCCP	FCCP					
G						FCCP	FCCP					
H						FCCP	FCCP					

Tabell 6.4: Skjematisk oversikt over substratoksidasjonsmetodens første forsøk. Én rute i tabellen tilsvarer én brønn på cellebrettet.

Andre forsøk:

		100 μ M OA, radioaktiv					400 μ M OA, radioaktiv					
Behandling:		Par + HSLH	HSLH	Tri	Basal		Basal		Tri	HSLH	Par + HSLH	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						FCCP	FCCP					
B						FCCP	FCCP					
C						FCCP	FCCP					
D						FCCP	FCCP					
E						FCCP	FCCP					
F						FCCP	FCCP					
G						FCCP	FCCP					
H						FCCP	FCCP					

Tabell 6.5: Skjematisk oversikt over substratosidasjonsmetodens andre forsøk. Én rute i tabellen tilsvarende én brønn på cellebrettet.

6.3.10 Oppsett til utsåing av celler til qPCR-forsøk.

WESTERN (40 μ M BSA)	WESTERN (100 μ M OA)	PCR (40 μ M BSA)	PCR (40 μ M BSA)
WESTERN (40 μ M BSA)	WESTERN (100 μ M OA)	PCR (100 μ M OA)	PCR (100 μ M OA)
WESTERN (40 μ M BSA)	WESTERN (100 μ M OA)	PCR (400 μ M OA)	PCR (400 μ M OA)

Tabell 6.6: Skjematisk oversikt over utsåing til qPCR-forsøk. Én rute i tabellen tilsvarende én brønn på cellebrettet.